

Generierung und Charakterisierung eines neuen Donorstammes für die Influenza Saatvirusher- stellung und die Charakterisierung von Influenza Viren in verschiedenen Wirtssystemen.

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer.nat.)

dem

Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Sybille Bertram geb. Jung
aus Haiger

Marburg an der Lahn
2010

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

Am 07.08.2010 angenommen.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs.

Erstgutachter: Prof. Dr. Michael Bölker

Zweitgutachter: Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk

Tag der mündlichen Prüfung am 11.11.2010

Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Erhard Bremer

Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	4
Tabellenverzeichnis.....	6
1 Einleitung	1
1.1 Taxonomie.....	1
1.2 Morphologie.....	3
1.3 Genomorganisation und kodierte Proteine	4
1.4 Replikation	7
1.5 Wirtsspektrum, Pathogenität und Virulenz	10
1.6 Molekulare Grundlagen und Genetik	13
1.7 Epidemiologie der menschlichen Influenzaviren	14
1.8 Pathogenese und Klinik.....	16
1.9 Impfstoffe und Therapie	17
1.10 Zielstellung	20
2 Material.....	22
2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	22
2.2 Antikörper	26
2.3 Verwendete Primer.....	26
2.4 Verwendete Plasmide	28
2.5 Das Expressionssystem	28
2.6 Virusstämme	29
2.7 Puffer und Lösungen	30
2.8 Zellen und Medium	31
2.8.1 Die MDCK Zelle.....	31
2.8.2 Zellkulturmedium.....	32
3 Methoden	33
3.1 Zellkultur	33
3.2 Virusanzucht.....	33
3.2.1 Virusanzucht im Hühnerei.....	33
3.2.2 Virusanzucht in der Zellkultur	34
3.2.3 Virusanzucht in Humanen Bronchialen Epithelzellen (HBEC)	35
3.3 Virusherstellung mittels viraler cDNA („Rescue“).....	35
3.3.1 Transfektion von MDCK33016 PF Zellen.....	36
3.4 Hämagglutinationstest (HA–Test).....	37
3.5 Plaquepassagierung	38
3.6 Titration mittels Durchflusszytometrie	39
3.7 Titration mittels Fokus Test	40
3.8 MuNANA Test.....	41
3.9 Sequenzierung.....	42
3.9.1 RNA Isolierung.....	42

Inhaltsverzeichnis

3.9.2	Reverse Transkription	42
3.9.3	Aufreinigung von PCR Produkten aus Agarose-Gelen und Sequenzierung	45
3.10	Nachweis von Proteinen im Western Blot	46
3.10.1	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	46
3.10.2	Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose-Membranen	47
3.10.3	Detektion viraler Proteine mittels des WesternBreeze®Chromogenic Kit	47
3.11	Real Time Detektion PCR	48
3.12	Untersuchung der Polymerasekomplexe mit Hilfe des Luciferase Reporterassay	50
3.12.1	Transfektion und Zellyse	51
3.12.2	Luciferase Test	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Vergleiche zwischen Ei- und Zellviren.....	52
4.1.1	Bestimmung der durch Mehrfach-Passagierung entstandenen Mutationen in HA und NA	52
4.1.2	Wachstum von ei- und zellgewachsenen Viren auf humanen Bronchialzellen.....	53
4.1.3	Unterschiede der Neuraminidaseaktivität durch Wachstum in unterschiedlichen Wirtssystemen	54
4.2	Herstellung eines für die MDCK33016 PF Zelle geeigneten Donors	55
4.2.1	Wachstumskinetiken des Virus NB # 105 während der Passagierung.....	57
4.2.2	Bestimmung, der während der Passagierung entstandenen Mutationen des Virus NB # 105	58
4.2.3	EM Aufnahmen der untersuchten Viren.....	59
4.2.4	Neuraminidaseaktivität des Virus NB # 105.....	61
4.2.5	Wachstumsvergleich von NB # 105 mit A/Puerto Rico/8/34 auf der MDCK33016 PF Zelle.....	63
4.2.6	Wachstumsuntersuchungen der Viren PR8 NYMC, PR8 RKI und NB #105 unter Anwesenheit des ERK Inhibitors U0126.....	64
4.2.7	Wachstum der Viren PR8 NYMC, PR8 RKI und NB # 105 im Plaquetest.....	67
4.2.8	Wachstumsvergleich von PR8 NYMC und PR8 RKI mit NB # 105 in Hühnereiern	68
4.2.9	Untersuchung der Polymeraseaktivität mit den Plasmiden von PR8 NYMC und NB # 105.....	69
4.2.10	Wachstumskurven der rekombinanten Viren.....	71
5	Diskussion.....	79
5.1	Vergleiche zwischen Ei- und Zellviren.....	79
5.2	Untersuchungen eines MDCK33016 PF-basierten Donorvirus im Vergleich mit A/Puerto Rico/8/34	83
5.2.1	Wachstumsverhalten von NB # 105 im Vergleich zu A/Puerto Rico/8/34.....	86
5.2.2	Wachstumsverhalten der Viren NB # 105, PR8 NYMC und PR8 RKI unter Zugabe des Inhibitors U0126	87
5.2.3	Neuraminidaseaktivität des Virus NB # 105 während des Wachstums auf MDCK33016 PF Zellen im Vergleich zu PR8 NYMC und PR8 RKI.....	90
5.2.4	Untersuchung der Polymeraseaktivität von NB # 105 und PR8 NYMC.....	91
5.2.5	Vergleiche des Wachstumsverhaltens der durch Reversen Genetik hergestellten Viren	93
6	Zusammenfassung	96
	Literaturverzeichnis	97

Inhaltsverzeichnis

A	Anhang	107
A.1	Sequenzdaten des HA der ei- und zellgewachsenen Viren.....	107
A.2	Sequenzvergleich von NB # 105, PR8 NYMC, PR8 RKI (HA und NA)	108
A.3	Abkürzungsverzeichnis.....	109
A.4	Abkürzungen der Aminosäuren	112
A.5	Lebenslauf	113

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Influenzavirus.....	3
Abbildung 1.2 Schematische Darstellung eines Influenza A Virus Partikels	4
Abbildung 1.3 Darstellung des Ribonukleoproteins (RNP).....	8
Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Influenza A Replikation	10
Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der Reassortierung	14
Abbildung 1.6 Schematische Darstellung der Entstehung des H1N1 PandemieVirus.	16
Abbildung 2.1 Verwendete Marker mit den jeweiligen Größenangaben	26
Abbildung 2.2 Vektor pKS 10.....	29
Abbildung 3.1 Schematische Darstellung einer bronchialen Zellschicht (links). Der Aufbau einer Zellkulturplatte für Bronchialzellen (rechts).	35
Abbildung 3.2 Plasmidsystem für die Generierung von Influenza Viren.	36
Abbildung 3.3 Darstellung der verschiedenen Agglutinationsstufen.....	38
Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Schichtung in der Blotapparatur.	47
Abbildung 3.5 Schematische Darstellung des Luciferasetest Systems.....	50
Abbildung 4.1 Relative Neuraminidaseaktivität der zellgewachsenen Viren im Vergleich mit den jeweiligen Eiviren.....	55
Abbildung 4.2 Historie des Virus NB # 105 von der Isolierung bis zum Donorstamm.	57
Abbildung 4.3 Wachstumsverhalten des Virus NB # 105 während der Plaquepassagierung.	57
Abbildung 4.4 Titer des Virus NB # 105 während der Passagierung.	58
Abbildung 4.5 EM Aufnahmen von NB # 105	60
Abbildung 4.6 EM Aufnahme von PR8 NYMC	61
Abbildung 4.7 Neuraminidaseaktivität des Virus NB # 105.	62
Abbildung 4.8 Vergleich der Neuraminidaseaktivität der Viren PR8 NYMC, PR8 RKI und NB # 105. ...	63
Abbildung 4.9 Wachstumskurve von NB # 105 im Vergleich zu beiden PR8 Viren.....	64
Abbildung 4.10 Phosphorylierungsmuster von ERK in MDCK33016 PF Zellen während der Infektion mit Influenza A Viren	65
Abbildung 4.11 Infektiöse Titer mit und ohne Inhibitor U0126 (10 μ M).	66
Abbildung 4.12 Wachstumskurve von NB # 105 und PR8 NYMC mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors.	67
Abbildung 4.13 Plaquetest der verschiedenen Viren.....	68
Abbildung 4.14 Titer der Viren beim Wachstum auf Eiern.	69
Abbildung 4.15 Luciferase Test der Polymerasen von PR8 NYMC und NB # 105.	71

Inhaltsverzeichnis

Abbildung 4.16 Wachstumskurve der rekombinanten H1N1 Viren.....	73
Abbildung 4.17 Wachstumskurve der rekombinanten Viren mit pandemischem H1N1.....	74
Abbildung 4.18 Wachstumskinetik der rekombinanten Viren mit pandemischem H1N1.....	75
Abbildung 4.19 Wachstumskurve der rekombinanten H3N2 Viren.....	76
Abbildung 4.20 Wachstumskurve der rekombinanten Viren mit Austauschen in PA, NP oder PA/NP	77
Abbildung 4.21 RTD-PCR der rekombinanten Viren mit Austauschen in PA, NP oder PA/NP	78

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.1 Orthomyxoviridae und ihr Wirtsspektrum.	2
Tabelle 1.2 Influenza A Proteine und deren Eigenschaften und Funktionen.....	6
Tabelle 2.1 Chemikalien	22
Tabelle 2.2 Verbrauchsmaterialien	23
Tabelle 2.3 Geräte	24
Tabelle 2.4 Verwendete Kits	25
Tabelle 2.5 Verwendete Marker	25
Tabelle 2.6 Antikörper.....	26
Tabelle 2.7 Primer	26
Tabelle 2.8 Plasmide.....	28
Tabelle 2.9 Viren.....	30
Tabelle 2.10 Puffer und Lösungen.....	30
Tabelle 3.1 Pipettierschema der RT-PCR Reaktion mit dem TaKaRa One Step Kit.	43
Tabelle 3.2 Standard Profil der RT-PCR mit TaKaRa One Step Kit.	43
Tabelle 3.3 Spezifische Daten der PCR Zyklen.....	44
Tabelle 3.4 Pipettierschema der RT PCR Reaktion mit dem Qiagen OneStep RT-PCR Kit.	44
Tabelle 3.5 Standard Profil der RT PCR mit Qiagen OneStep RT-PCR Kit.	45
Tabelle 3.6 Zusammensetzung des NuPAGE Geles	46
Tabelle 3.7 RTD-PCR-Ansatz	49
Tabelle 3.8 Zeitprofil der RTD-PCR	49
Tabelle 4.1 Mutationen der verschiedenen Viren in Passage 5.	53
Tabelle 4.2 Vergleich des Wachstums der Viren auf HBEC.	54
Tabelle 4.3 Auswertung der Mutationen des Virus NB # 105 (H1N1) nach 30 Passagen.	59
Tabelle 4.4 Schematische Darstellung der getesteten Viren	72

1 Einleitung

Eine Impfung ist der beste Schutz vor vielen Krankheiten, wie zum Beispiel FSME (Früh-sommer-Meningo-Enzephalitis), Tollwut, Hepatitis B oder Influenza. Dadurch können bleibende gesundheitliche Schäden vermieden und die Sterberate gesenkt werden. Durch die Vermeidung krankheitsbedingter Arbeitsausfälle kommt ihr eine wirtschaftliche Bedeutung zu. Der Influenza-Impfstoff muss jedes Jahr neu angepasst werden, da sich Inflenzaviren sehr schnell antigenetisch verändern („antigenetic drift“), daher ist man durch eine Impfung gegen die Inflenzaviren nur einer Grippe-saison geschützt. Im darauffolgenden Jahr muss der Impfschutz mit den aktuellen Grippe-erregern erneuert werden. Deshalb müssen jedes Jahr schnell große Mengen an Impfstoff für die Bevölkerung produziert werden, um in der Inflenzasaison (Oktober bis April für die nördliche Hemisphäre; Mai bis September für die südliche Hemisphäre) verfügbar zu sein. Im Falle einer Influenza-Pandemie, bei der ein neuartiger Influenza-Erreger plötzlich in der Bevölkerung auftritt, muss deutlich schneller reagiert werden. Einen Vorteil bietet die Produktion des Inflenzaimpfstoffes auf Zellkulturbasis, wie sie unter anderem von Novartis Vaccines & Diagnostics genutzt wird. Trotz Verbesserung des Prozesses durch Nutzung von Zellen müssen stets weitere Optimierungsarbeiten durchgeführt werden. Eine schnellere Verfügbarkeit und bessere Ausbeute des Impfstoffes ist dabei von zentraler Bedeutung. Essentiell für die Optimierung des Impfstoffherstellungsprozesses ist das Verständnis des Infektionsverhaltens der verschiedenen Viren in unterschiedlichen Wirtssystemen.

1.1 Taxonomie

Influenza A Viren gehören zur Familie der Orthomyxoviridae. Sie bestehen aus einem segmentierten RNA-Genom, das in negativer Orientierung vorliegt. Es gibt Inflenzaviren der Genera A, B und C, des Weiteren gehören zu den Orthomyxoviridae die Thogotoviren und die Isaviren (Tabelle 1.1). Die Einteilung der Inflenzaviren erfolgt durch die serologischen Eigenschaften des Nukleoproteins (NP) und des Matrixproteins (M) der einzelnen Viren. Zusätzlich ist die Anzahl der Genomsegmente zwischen den verschiedenen Inflenzavirus-Typen unterschiedlich. Während Influenza A und B Viren acht Segmente besitzen, haben Influenza C Viren nur sieben Segmente.

Einleitung

Außerdem unterscheiden sich Influenza A und B Viren auf Grund ihrer Oberflächenproteine von Influenza C Viren. Erstere tragen auf der Oberfläche zwei Glykoproteine, das Hämagglutinin (HA) und die Neuraminidase (NA). Eine Unterteilung in verschiedene Subtypen erfolgt anhand der antigenen Eigenschaften dieser Oberflächenproteine (HA und NA). Bisher sind 16 HA (H1-H16) und 9 NA (N1-N9) Subtypen bekannt (Fouchier *et al.*, 2005; Rohm *et al.*, 1996; Webster *et al.*, 1992).

Tabelle 1.1 Orthomyxoviridae und ihr Wirtsspektrum.

Genus	Betroffene Spezies
Influenzavirus A	Mensch, Schweine, Pferde, See- hunde, Puten, Enten, Möwen etc.
Influenzavirus B	Mensch, Robben
Influenzavirus C	Mensch, Schweine
Thogotovirus (Thogotovirus; Dhori- Virus)	Zecken, Rinder, Schafe, Ziegen, Nagetiere
Isavirus (Salmon Anemia Virus)	Lachs (<i>Salmo salar</i>)

nach Falke & Modrow, Molekulare Virologie, 2. Auflage

Die Influenza C Viren besitzen ein einziges Oberflächenglykoprotein, welches Hämagglutinin-Esterase-Fusions-Protein (HEF) genannt wird. Dieses Protein vereint die Eigenschaften des Hämagglutinins und der Neuraminidase. Aufgrund dieses Proteins werden die Influenza C Viren einem eigenen Genus zugeordnet.

Die Influenzaviren werden nach einem Schema benannt, welches einheitlich 1980 von der WHO festgelegt wurde. Als erstes wird der Influenzavirustyp angegeben (Influenza A, B oder C) daraufhin folgt die Wirtsspezies, welche bei humanen Viren entfällt. Als nächstes folgt der Ort der Erstisolation, die Nummer des Isolats und Isolationsjahr. Der Subtyp von Influenza A Viren wird in Klammern angefügt – beispielsweise Influenza A/Puerto Rico/8/34 (H1N1).

Einleitung

1.2 Morphologie

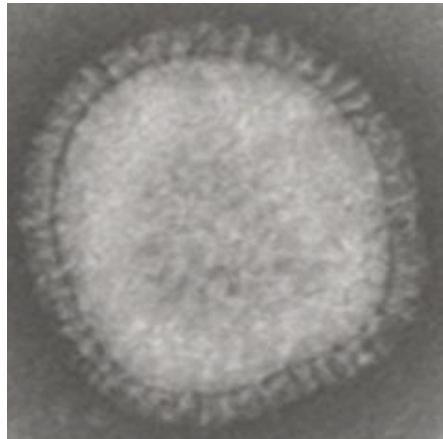


Abbildung 1.1 Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Influenzavirus

(NB # 105 H1N1) hergestellt an der Philipps Universität Marburg

Die Viruspartikel der Orthomyxoviren können sich verschiedene Morphologie aufweisen. Sie besitzen entweder eine sphärische oder filamentöse Form und haben einen Durchmesser von 80–100 nm. Die Viren sind membranumhüllt und besitzen ein einzelsträngiges RNA Genom, welches negativ orientiert vorliegt. Influenza A und B Viren haben acht, Influenza C Viren sieben Segmente. Die RNA-Segmente liegen vom Nukleokapsidprotein (NP) umhüllt vor. Außerdem befindet sich an den 3'-Enden jedes Segments der virale Polymerasekomplex, bestehend aus PB2, PB1 und PA, dieser Komplex wird auch Ribonukleoprotein (RNP) genannt. Die Hüllmembran der Viren stammt von der Wirtszelle. In diese werden die Oberflächenproteine der jeweiligen Influenzaviren eingelagert. Bei Influenza A und B sind dies die Oberflächenglykoproteine HA und NA. HA liegt in der Membran als Trimer vor und dient dem Virus zur Anheftung an die Wirtszelle über Sialinsäuren, außerdem ist es essentiell für die Membranfusion im späten Endosom. Die tetramere NA spaltet die endständigen Sialinsäuren von viralen und zellulären Proteinen und Lipiden ab. Dies verhindert die Verklumpung der Viren untereinander und die Neuinfektion einer bereits infizierten Zelle. Bei Influenza C Viren vereinigt das Hämagglutinin-Esterase-Fusions-Protein (HEF) die Eigenschaften der Neuraminidase und des Hämagglutinins (Herrler *et al.*, 1981; Herrler *et al.*, 1985) Des Weiteren besitzen die Influenza A Viren ein Membran Protein (M2), welches als Ionenkanal fungiert (Pinto *et al.*, 1992; Pinto & Lamb, 2006; Sugrue & Hay, 1991) und in geringer Kopienzahl vorliegt. Influenza B und C Viren besitzen zu M2 homologe Proteine, die allerdings auf einem anderen Gensegment kodiert werden. Im

Einleitung

Viruspartikel befindet sich außerdem in geringer Kopienzahl das nukleäre Exportprotein/Nichtstrukturprotein 2 (NEP/NS2) (Yasuda *et al.*, 1993). Das Nichtstrukturprotein 1 (NS1) ist nur in der infizierten Zelle zu finden und konnte bisher nicht im Viruspartikel nachgewiesen werden.

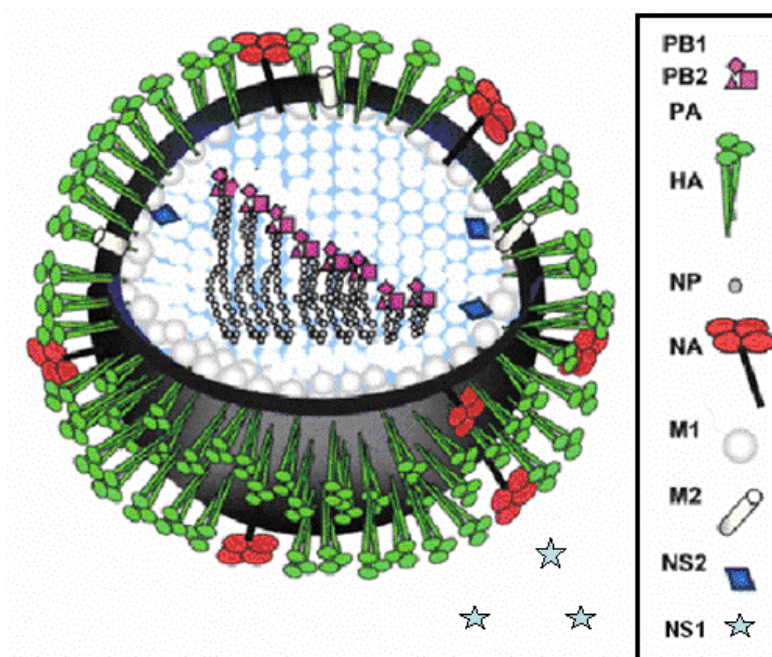


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung eines Influenza A Virus Partikels

(Adaptiert nach Anke Feldmann)

1.3 Genomorganisation und kodierte Proteine

Das Genom der Influenza A und B Viren besteht aus acht einzelsträngigen RNA-Segmenten (vRNA). Die vRNA liegt in negativer Orientierung vor und ist nicht infektiös. Von ihr wird die messenger-RNA (mRNA) transkribiert, welche dann in positiver Orientierung vorliegt und von der die viralen Proteine translatiert werden. Die gesamte RNA liegt außerdem mit Nukleoproteinen enkapsidiert vor, wobei jedes Nukleoprotein ca. 20-26 Nukleotide bedeckt (Compans *et al.*, 1972; Ortega *et al.*, 2000). Die Größe des Genoms beträgt ca. 13,6 kb, wobei die kodierenden Bereiche von nichtkodierenden flankiert werden. Am 3'-Ende bilden die ersten 12 und am 5'-Ende die ersten 13 Nukleotide nichtkodierende Regionen. Diese sind sowohl innerhalb der acht Segmente als auch bei den verschiedenen Influenza A Stämmen hochkonserviert (Desselberger *et al.*, 1980). Sie bilden die für Inflenzaviren spezifischen Promotorstrukturen für Transkription und Replikation, welche von der viralen Polymerase erkannt werden können (Li & Palese,

Einleitung

1992;Parvin *et al.*, 1989). Für die Struktur des Promotors gibt es unterschiedliche Modelle. Eines der Modelle besagt, dass nur einzelne Nukleotide der RNA am 3'- und 5'-Ende Paarungen eingehen und sich die RNA somit wie ein Korkenzieher umeinander windet (Flick *et al.*, 1996;Flick & Hobom, 1999). Demgegenüber steht das Pfannenstiellmodell (Hsu *et al.*, 1987), welches besagt, dass die Enden der vRNA komplementär zueinander sind und Doppelstränge ausbilden. Dadurch erhält die RNA eine quasizirkuläre pfannenstiellähnliche Form. Das Erste Modell wird allerdings bevorzugt. Der influenzaspezifische Promotor dient der RNA-abhängigen RNA-Polymerase bestehend aus PB2, PB1 und PA als Startpunkt für Transkription und Replikation des Virusgenoms. Fünf der acht Genomsegmente sind monozistronisch und kodieren für jeweils ein Protein, (PB2, PA, NP, HA und NA), die anderen drei Segmente kodieren für jeweils zwei Genprodukte (M, NS und PB1). Die Proteine M1, M2, NS1 und NS2 entstehen durch alternatives Spleißen, wobei das zelluläre Spleißosom benutzt wird. Das PB1-F2 Protein entsteht durch einen überlappenden Leserahmen (+1 ORF) innerhalb von PB1. Die Funktion und Eigenschaften der verschiedenen Proteine sind in folgender Tabelle zusammengefasst.

Einleitung

Tabelle 1.2 Influenza A Proteine und deren Eigenschaften und Funktionen

Segment	Länge (bp)	Protein	Länge (AS)	Eigenschaften und Funktion
1	2341	PB2	759	Untereinheit des Polymerasekomplexes, Cap-Bindung, basisch
2	2341	PB1	757	Untereinheit des Polymerasekomplexes, katalysiert die Polymerisation der Nukleotide, basisch
		PB1-F2		Induktion der Apoptose, mitochondrielles Protein, Immunevasion
3	2233	PA	716	Untereinheit des Polymerasekomplexes, Endonukleaseaktivität, sauer
4	1778	HA	566	TypI Membranprotein, es wird in HA ₁ und HA ₂ durch trypsinähnliche Proteasen gespalten, Membranfusion, Rezeptorbindung an Sialinsäure, Induktion neutralisierender Antikörper
5	1565	NP	498	Enkapsidierung von vRNA und cRNA, Kernimport durch nukleäres Lokalisationssignal (NLS)
6	1413	NA	454	Typ II Membranprotein; Enzym, welches die endständigen Neuraminsäuren der Zellen abspaltet und so eine Neuinfektion bereits infizierter Zellen und das Verkleben der Viren verhindert. Induktion neutralisierender Antikörper
7	1027	M1	252	Matrixprotein, Hauptkomponente des Virus, aktive Beteiligung an der Virusmorphogenese
		M2	97	TypIII-Membranprotein, bewirkt durch Protoneneinstrom die Lockerung der Verbindung des Matrixproteins mit dem Nukleoprotein
8	890	NS1	230	Nicht Strukturprotein 1, Interferon Antagonist; Inhibition des Spleißens, Polyadenylierung und Kernexport zellulärer mRNAs
		NS2/NEP	121	Nichtstrukturprotein 2, vermittelt den Kernexport der vRNPs

nach (Modrow *et al.*, 2003)

1.4 Replikation

Die Adsorption erfolgt über das Oberflächenglykoprotein Hämagglutinin (HA) an die Sialinsäuren, die als Rezeptor auf den Oberflächenproteinen der Wirtszelle fungieren. Hierbei unterscheiden sich humane und aviäre Influenzaviren hinsichtlich ihrer Neuraminsäureprävalenz. Aviäre Influenzaviren binden bevorzugt an α 2-3 glykosidisch an Galaktose gebundene Sialinsäuren, während humanpathogene Influenzaviren hauptsächlich α 2-6 gebundene Sialinsäuren nutzen. (Connor *et al.*, 1994; Gagneux *et al.*, 2003). Nach der Adsorption des Virus erfolgt eine Clathrin-vermittelte Endocytose. Die anschließende Ansäuerung der Endosomen durch zelluläre H⁺-ATPasen bewirkt eine Konformationsänderung des HA, wodurch die Verschmelzung der endosomalen mit der viralen Membran vermittelt wird. Für die Fusionsaktivität muss das HA gespalten vorliegen (Klenk *et al.*, 1975). Dadurch wird die fusogene Region des HA₂-Proteinfragments exponiert und gelangt in unmittelbare Nähe der Endosomenmembran. Dieses hydrophobe Fusionspeptid befindet sich am N-Terminus des HA₂-Fragments und besteht aus 20 hydrophoben Aminosäuren (AS 330-350).

Durch den M2 vermittelten Einstrom von Protonen erfolgt eine Ansäuerung des Virusinneren (Pinto *et al.*, 1992), was die Ablösung der Ribonukleoproteine (RNPs) vom M1-Protein bewirkt und zu dessen Freisetzung führt. Auf Grund der Kernlokalisationssequenzen der Nukleoproteine (NP) werden die RNPs über zelluläre Transportwege in den Zellkern transportiert (Wang *et al.*, 1997; Whittaker *et al.*, 1996). Dort erfolgt die Replikation und Transkription des Virusgenoms. Zu Beginn der Transkription werden die vRNAs durch den viralen Polymerasekomplex, der aus PB1, PB2 und PA besteht und an die 5' und 3'-Enden der RNPs gebunden ist (Hay *et al.*, 1977), transkribiert.

Einleitung

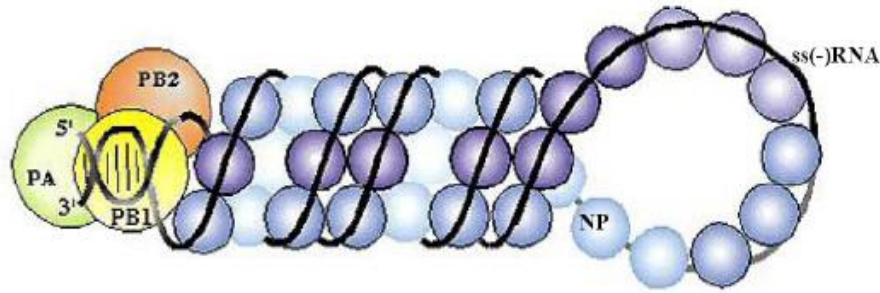


Abbildung 1.3 Darstellung des Ribonukleoproteins (RNP) mit den gebundenen Proteinen des Polymerasekomplexes (PB1, PB2, PA) und den mit der RNA komplexierten Nukleoproteinen (Portela & Digard, 2002)

Da die virale RNA-abhängige RNA-Polymerase weder 5'-Cap-Gruppen modifizieren noch methylieren kann, ist sie nicht in der Lage die Transkription der viralen Proteine einzuleiten. Zu diesem Zweck wird ein spezieller Mechanismus benötigt, der es ermöglicht, 5'-Cap-Strukturen durch die zelluläre Polymerase II auf virale mRNA zu übertragen. Für diesen Prozess des „Cap-Stealing“ ist die PB2-Untereinheit der Polymerase von besonderer Bedeutung. Diese bindet zur Initiation mit den AS 326-432 an 5'-Cap-Gruppen zellulärer mRNAs und lagert diese 5'-Enden an 3'-Enden viraler RNAs an (Guilligay *et al.*, 2008). Hierbei handelt es sich bei dem terminalen Nukleotid immer um ein Uridin, welches mit einem Adeninrest in den ersten 10 bis 13 Basen der zellulären mRNA hybridisiert. Anschließend schafft die PA-Untereinheit durch ihre eigene Cap-bindungsabhängige Nukleaseaktivität freie 3'-OH-Enden, indem sie am Adenin spaltet (Dias *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2009). Die freien 3'-OH-Enden fungieren wiederum als Primer für die darauf folgende Transkriptionselongation (Shi *et al.*, 1995; Ulmanen *et al.*, 1981). Durch dieses „5'Cap-Stehlen“ (Cap-snatching) ergibt sich ein praktischer Nebeneffekt: Die Transkription und Translation der Wirtszelle wird unterbrochen (Virus host shut off). Das PB1, welches die eigentliche Transkriptase darstellt (Biswas & Nayak, 1994), verlängert anschließend die mRNA. Die Elongation durch das PB1 endet etwa 15 bis 20 Nukleotide vor dem 5'-Ende der vRNA. Dort wird die Polymerase zum Stottern veranlasst, was zu einem PolyA Schwanz führt, da dieser Bereich eine Uridinreiche Region beinhaltet, die das Signal zur Polyadenylierung der neu synthetisierten Transkripte trägt (Li & Palese, 1994; Luo *et al.*, 1991; Poon *et al.*, 1998). Die mRNAs der Gensegmente 7 und 8 werden durch die zellulären Spleißosomen teilweise gespleißt. Die viralen mRNAs werden nach Abschluss der Synthese aus dem Zellkern in das Zytoplasma exportiert (Whittaker *et al.*, 1996). Daran sind sowohl zelluläre als auch virale Komponenten (NP-Protein) beteiligt. An der Membran des rauen

Einleitung

endoplasmatischen Retikulums (rER) findet die Translation der membranassoziierten Proteine HA, NA und M2 statt. Diese Proteine werden direkt in das rER synthetisiert, bleiben in der Membran verankert und werden über den Golgi-Apparat und das Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) zur Zelloberfläche transportiert. Während dieses exozytotischen Transportwegs werden das HA- und NA-Protein glykosyliert, das M2-Protein phosphoryliert und HA und M2 werden zusätzlich palmitoyliert (Ponimaskin & Schmidt, 1998; Schroeder *et al.*, 2005). Des Weiteren durchlaufen NA, M2 und das Vorläufer-HA während dieses Transportwegs Reifungsprozesse, bei denen NA und M2 Tetramere und HA Trimere bilden, bevor sie in die Plasmamembran eingebaut werden.

Die Translation der übrigen viralen Proteine PB1, PB2, PA, NP, M1, NS1 und NS2 findet an den freien Ribosomen im Zytoplasma statt. Auf Grund von Kernlokalisations-signalen werden diese Proteine nach ihrer Synthese zurück in den Zellkern transportiert (Neumann *et al.*, 1997; Whittaker *et al.*, 1996). Beim Umschalten vom Transkriptions- in den Replikationsmodus spielen die freien, neusynthetisierten Nukleoproteine (NP) eine tragende Rolle. Liegen sie in hohen Konzentrationen im Zellkern vor, kommt es zur Auflösung der pfannenstielähnlichen Strukturen der vRNA, wodurch die Transkription beendet wird. Dadurch wird die Synthese von vollständigen Gegensträngen (cRNAs) ermöglicht (Beaton & Krug, 1986), die als Vorlage zur Synthese neuer vRNAs dienen.

Das M1-Protein besitzt die Eigenschaft die vRNA-Replikation zu inhibieren und den Export der vRNA aus dem Zellkern zu beeinflussen (Martin & Helenius, 1991). An die vRNA lagern sich im Zellkern mehrere virale Nukleoproteine an und enkapsidieren diese. Anschließend wird die enkapsidierte vRNA (RNP) aus dem Nukleus in das Zytoplasma exportiert. Hierbei fungiert das NS2 Protein als Adaptor zwischen dem viralen RNP-M1-Komplex und trägt zum Export der vRNPs aus dem Zellkern in das Zytoplasma bei (O'Neill *et al.*, 1998). Die Glykoproteine HA, NA und M2 werden in der zellulären Plasmamembran eingelagert. Der vRNP-Komplex zusammen mit M1 folgt diesen nach. An der Zytoplasmamembran bilden sich die initialen Budding-Strukturen. Dabei stülpt sich die Zellmembran um das Nukleokapsid und das Virus wird durch Knospung freigesetzt. Das Matrixprotein als Bindungspartner von RNPs, HA, NA und der zellulären Membran ist die treibende Kraft im Knospungsprozess (Gomez-Puertas *et al.*, 2000). Das Budding der Influenza-Viren erfolgt an besonders Cholesterin-reichen Lipidstrukturen auf der Zelloberfläche der Wirtszelle, den so genannten Rafts (Scheiffele *et al.*, 1999). Während und nach diesem Vorgang werden Sialinsäurereste durch die katalytische Aktivität der NA von der Zelloberfläche und vom Virus abgespalten. Dadurch wird den

Einleitung

neu gebildeten Viren eine höhere Effizienz bei der Freisetzung und Ausbreitung ermöglicht. Die entstandenen Nachkommen-Viren können nun weitere Zellen infizieren.

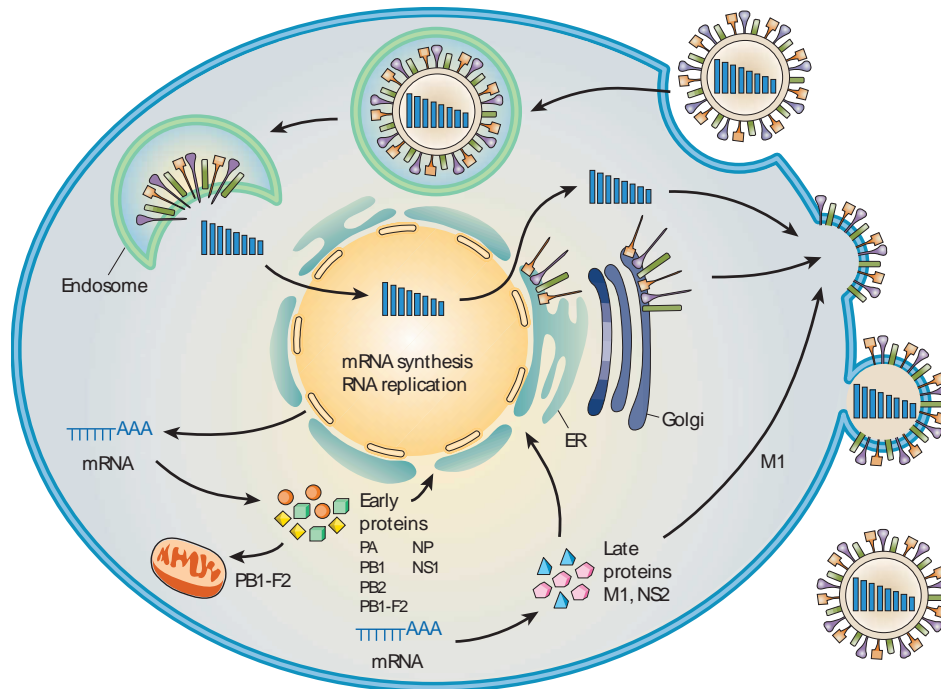


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung der Influenza A Replikation

(Neumann *et al.*, 2009)

1.5 Wirtsspektrum, Pathogenität und Virulenz

Durch das Wirtsspektrum werden alle Arten gekennzeichnet, die sich durch einen bestimmten Erreger effizient infizieren lassen. Influenzaviren besitzen ein sehr breites Wirtsspektrum, das vor allem Vögel, aber auch Säuger wie z.B. Menschen, Schweine, Seehunde und Pferde umfasst. Die Eigenschaft eines bestimmten Erregers, eine Krankheit hervorzurufen, bezeichnet man als Pathogenität. Die Virulenz gibt den Grad der Pathogenität einer Erregerpopulation an und wird im Tierexperiment durch die für 50 % der Tiere letale Dosis (LD_{50}) quantifiziert. Die Virulenz und die Pathogenität sind immer abhängig von der Interaktion viraler Genprodukte mit Wirtsfaktoren. Auf Grund dessen müssen die Virulenz und die Pathogenität immer im Zusammenhang mit der Wirtsspezies gesehen werden. Für den Menschen sind die Subtypen H1N1, H2N2, H3N2 und das 1997 isolierte Influenza A Virus des Subtyps H5N1 pathogen. Letzteres ist direkt vom Vogel auf den Menschen übergegangen, ist bisher aber noch nicht von Mensch zu Mensch übertragbar. Allerdings besitzt es deutlich pandemisches Potential, da immer wieder humane Fälle auftreten, die zum Teil schwere Verläufe zeigen. Einige genetische

Einleitung

und phylogenetische Studien zeigen, dass jedes Virusgen, das aus Säugern im letzten Jahrhundert isoliert wurde, einen aviären Ursprung besitzt (Bean *et al.*, 1992; Gorman *et al.*, 1990b; Gorman *et al.*, 1990a; Ito *et al.*, 1991; Kawaoka *et al.*, 1989). Bei der Wirtsspezifität spielen die beiden Oberflächenproteine HA und NA eine wichtige Rolle.

Die Pathogenität wird durch Veränderungen im HA beeinflusst. Alle HA-Proteine erkennen terminale sialinsäurehaltige Rezeptoren. Die Influenzastämme variieren jedoch in ihrer Rezeptorspezifität. Humane Influenzaviren bevorzugen α 2-6 glykosidische Bindungen, während aviäre Influenzaviren an Sialinsäuren, die α 2-3 glykosidisch an Galaktose gebunden sind, binden (Rogers *et al.*, 1983; Rogers & Paulson, 1983). Diese Unterscheidung kommt dadurch zustande, dass Epithelzellen des humanen Respirationstraktes hauptsächlich α 2-6 glykosidisch gebundene Sialinsäuren und Epithelzellen des Entenintestinaltraktes α 2-3 glykosidisch gebundene Sialinsäuren besitzen (Baum & Paulson, 1990). So kann es während der Passagierung von humanen Influenzaviren in Hühnereiern immer wieder zu Mutationen der Rezeptorbindungsstelle kommen (Gambaryan *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2005; Widjaja *et al.*, 2006). Diese Mutationen können zu Veränderung der Antigenität der Viren führen, während sich auf MDCK Zellen keine Mutationen etablierten (Katz & Webster, 1988). Unterschiede in der Rezeptorbindetasche des HA sind hauptsächlich für die Spezifität von aviärem HA für α 2-3 Bindungen und humanem HA für α 2-6 Bindungen zuständig. Im humanen HA (H3N2) steht an Aminosäureposition 226 ein Leucin und an Position 228 ein Serin, beim aviären HA ein Glutamin und Glycin. Außerdem besitzen humane H1N1 Viren an Position 186 Serin und an 225 Asparagin während aviäre H1N1 Viren 186 Prolin und 225 Glycin besitzen. Generell führen Mutationen der Rezeptorbindungsstelle des HA mit dem 130-Loop (AS 134-142), dem 150-Loop (AS 150-156), der 190-Helix (AS 181-193) und dem 220-Loop (AS 220-230) (H3 Nomenklatur) zu einer veränderten Rezeptorspezifität (Skehel & Wiley, 2000).

Bei der Fusion der Virushülle mit der Endosomenmembran wird das Fusionspeptid exponiert. Dazu muss das HA in der gespaltenen Form vorliegen. Eine wichtige Determinante für den Tropismus und die Pathogenität des Virus ist die Verteilung der HA-aktivierenden Proteasen in der Wirtszelle. Die niedrig- bzw. nichtpathogenen Influenzaviren der Vögel besitzen eine monobasische Spaltstelle, die durch extrazelluläre Trypsin-ähnliche Proteasen (wie zum Beispiel die Serinproteasen TMPRSS2 und HAT) (Bottcher *et al.*, 2006) erkannt und gespalten wird. Die Verteilung des Virus wird durch das Vorkommen geeigneter Proteasen limitiert. Das HA-Vorläufer-

Einleitung

protein vieler hochpathogener aviärer Viren besitzt dagegen eine multibasische Spaltstelle mit der Erkennungssequenz R-X-K/R-R-G, wobei zwischen Arginin und Glycin gespalten wird. Diese Spaltstellen werden durch ubiquitär vorkommende Proteasen wie die Subtilisin-ähnlichen Endoprotease Furin gespalten (Stieneke-Grober et al., 1992). Diese Stämme besitzen deswegen meist die Fähigkeit, verschiedene Zelltypen zu infizieren, und können dadurch eine systemische Infektion hervorrufen.

Die meisten humanpathogenen Influenza A gehören zu den Subtypen H1N1, H2N2 und H3N2, deren HA eine monobasische Spaltstelle besitzt und die mit Ausnahme des 1918-Stammes durch Reassortierung entstanden sind. Für die erhöhte Pathogenität des H5N1 Virus werden eine multibasische Spaltstelle im HA und eine Mutation in der Polymerase-Untereinheit PB2 (Isoleucin an Position 627) verantwortlich gemacht (Subbarao *et al.*, 1998).

Die Neuraminidase ist neben dem HA ein weiterer bedeutender Pathogenitätsfaktor. Die HA-Bindungsfähigkeit und die katalytische Aktivität der NA (Spaltung des Rezeptors) stehen im Gleichgewicht zueinander. Stimmt dieses Verhältnis kommt es zu einer produktiven Infektion (Katinger et al., 2004). Des Weiteren ist die Stiellänge des NA in Verbindung mit der Glykosylierung des HA für die Infektion von MDCK Zellen von Bedeutung (Zhirnov *et al.*, 2009). Bei dem mausadaptierten humanen H1N1 Isolat A/WSN/33 kann die Neuraminidase den ubiquitär vorkommenden Plasmin-Vorläufer Plasminogen rekrutieren, welcher in der Lage ist das HA zu spalten (Goto & Kawaoka, 2000). So kann es trotz monobasischer Spaltstelle zu einer systemischen Infektion kommen.

Das NS1 Protein befindet sich als Nichtstrukturprotein nicht in den Virionen (Lamb & Takeda, 2001). Trotzdem spielt es während der Infektion eine sehr wichtige Rolle. In der frühen Phase der Infektion kann NS1 durch die Aktivierung des PI3K-Akt Weges, welcher die Apoptose verhindert, eine effektive Virussynthese gewährleisten (Zhirnov & Klenk, 2007). In der späten Phase der Infektion wird durch NS1 der NF- κ B Weg induziert, der dazu führt, dass die Viren effektiv freigesetzt werden. Wenn NF- κ B und der MAP Kinase Weg durch spezifische Inhibitoren unterdrückt werden, ist die Replikation der Viren gestört (Ludwig, 2009). A/Puerto Rico/8/34 Mutanten, die kein NS1 Gen besitzen, können in MDCK Zellen, Hühnerembryofibroblasten und 7 Tage alten Hühnerembryonen effektiver Apoptose hervorrufen als die wt Viren und waren somit letaler (Zhirnov et al., 2002).

Einleitung

Interne Virusproteine wirken sich ebenfalls auf die Pathogenität und das Wirtsspektrum aus. So führt zum Beispiel ein Austausch des PB1-Gens eines humanen Isolates mit dem eines aviären zu einer Attenuierung der Replikation in MDCK Zellen jedoch nicht in Hühnereiern (Snyder et al., 1987). Mutationen im PB1 Gen können zur gesteigerten Polymeraseaktivität eines Virus in bestimmten Systemen führen, was aber nicht automatisch mit einer gesteigerten Pathogenität einhergeht (Gabriel *et al.*, 2005).

Das NP der Influenza A und B Viren zeigt einen hohen Konservierungsgrad (Shu et al., 1993) und ist verantwortlich für den Übergang eines Virus von aviären Wirten auf den Säuger (Scholtissek et al., 1993). Mutationen des PB2 können durch eine Verbesserung der Virusreplikation zur erhöhten Pathogenität aviärer H5N1 Isolate in Mäusen beitragen (Subbarao *et al.*, 1998). Die viralen Proteine M1 (Anwar et al., 2006), M2 (Feng et al., 2006) und NS2 (Iwatsuki-Horimoto et al., 2004; Robb et al., 2009) zeigen oftmals Mutationen, die Viren an bestimmte Wirte anpassen und sie pathogener für bestimmte Spezies machen.

PB1-F2 besitzt einen Einfluss auf das Wachstum der Viren in Monozyten, indem es in diesen Zellen vermehrt Apoptose hervorruft (Chen et al., 2001). Man vermutet, dass PB1-F2 allgemein dazu beiträgt, Zellen der angeborenen Immunantwort zur Apoptose anzuregen und somit die Immunreaktion zu unterdrücken (Zamarin et al., 2005). Bei Isolaten aus bestimmten Tieren, vor allem Schweinen, ist der Leserahmen unterbrochen, so dass eine Expression des Proteins nicht stattfindet (Zell et al., 2007). Wenn PB1-F2 deletiert ist, können die Viren schneller aus der Lunge von Mäusen eliminiert werden (Zamarin et al., 2006), wodurch es zu einer leichteren Erkrankung kommt.

1.6 Molekulare Grundlagen und Genetik

Die Influenzaviren entgehen in zweifacher Hinsicht einem auf sie wirkenden Selektionsdruck. Zum einen durch „Antigenic drift“ und zum anderen der „Antigenic shift“. Aufgrund der fehlenden Korrekturlesefunktion (Proofreading) der RNA-abhängigen RNA-Polymerase kommt es zu hohen Fehlerraten mit einer Häufigkeit von 10^{-5} Mutationen pro Nukleotid pro Replikation. Solche neu erworbenen Punktmutationen können sich auch in antigenen Bereichen der Oberflächenproteine HA und NA befinden, wodurch eine neue Variante des Subtyps entsteht, die dann vom Immunsystem nicht mehr optimal erkannt werden kann („antigenic drift“). Des Weiteren gibt es die Möglichkeit des Austausches ganzer Gensegmente zwischen verschiedenen Influenza A Subtypen.

Einleitung

Solche sogenannten Reassortanten können entstehen, wenn eine Zelle von zwei verschiedenen Influenzaviren infiziert wird und bei der folgenden Zusammenlagerung der Nachkommenviren ein Austausch von Segmenten stattfindet (Abbildung 1.5). Von „antigenic shift“ spricht man, wenn die Gensegmente der Oberflächenproteine vertauscht wurden und somit die Entstehung neuer Subtypen mit abweichender Antigenität begünstigt wird (Scholtissek *et al.*, 1993). Südostasien ist häufig der Ursprung solcher Reassortanten, da dort Menschen, Schweine und Vögel auf engstem Raum zusammenleben. Schweine können sowohl von aviären als auch von humanen Influenzaviren infiziert werden und stellen somit eine Art Mischgefäß für die Reassortierung der viralen RNA-Segmente dar (Scholtissek *et al.*, 1993).

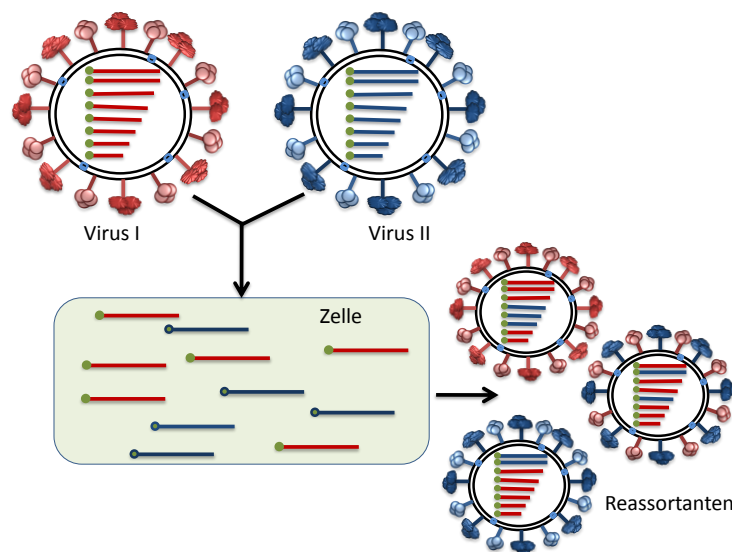


Abbildung 1.5 Schematische Darstellung der Reassortierung

1.7 Epidemiologie der menschlichen Influenzaviren

In den letzten hundert Jahren kam es zu vier großen Pandemien: 1918 die „Spanische Grippe“, 1957 die „Asiatische Grippe“, 1968 die „Hongkong-Grippe“ und 2009 die „Neue Influenza“, welche in relativ regelmäßigem Abstand auftraten. Zwischendurch gab es jedoch immer wiederkehrende kleinere Epidemien, die man als inter pandemische Influenza bezeichnet. Pandemien zeichnen sich dadurch aus, dass die Erkrankung zur gleichen Zeit weltweit verbreitet ist. Meist wird eine Pandemie durch das Auftreten eines neuen Virussubtyps ausgelöst. Gegen die Oberflächenantigene dieses neuen Subtyps besteht dann keine schützende Immunität in der Bevölkerung, da Antikörper gegen den bereits bekannten Subtyp keine Kreuzreaktion mit neuen Subtypen aufzeigen. Daher ist das Virus in der Lage, sich ungehindert auszubreiten. Die erste von vier großen

Einleitung

humanen Influenza-Pandemien, die „Spanische Grippe“, trat 1918/1919 auf und forderte mit etwa 50 Millionen Toten die meisten Menschenleben (Taubenberger & Morens, 2006). Es handelt sich dabei um ein Virus des Subtyps H1N1, dessen Ursprung bisher nicht vollständig geklärt werden konnte. Vermutlich handelt es sich um ein Virus aviären Ursprungs, welches unter Beibehaltung aller acht Gensegmente auf Schwein und Mensch übertragen wurde. Es kam dabei zur Anhäufung von Punktmutationen, die sowohl die Übertragbarkeit von Mensch zu Mensch als auch die Pathogenität des Virus erhöhten (Taubenberger *et al.*, 1997).

Die nachfolgenden Pandemiestämme gehörten zu den Subtypen H2N2 (1957/58) und H3N2 (1968). Es handelte sich hierbei um reassortierte Viren, die Gene aviären Ursprungs enthielten. 1957 waren es drei Gene (HA, NA und PB1); 1968 waren es zwei (HA und PB1) (Kawaoka *et al.*, 1989).

1997 wurde die erste Erkrankung mit einem H5N1-Stamm dokumentiert (Yuen *et al.*, 1998). Neuere Isolate zeigen Mutationen in den Polymerasegenen, die sich der Genomsequenz des humanen 1918-Isolats angleichen (Taubenberger *et al.*, 2005). Für 6 von 18 infizierten Personen verlief die Infektion tödlich. Das Virus besitzt einen aviären Ursprung und wurde direkt vom Geflügel auf den Menschen übertragen. Es hatte das Schwein als Mischgefäß („mixing vessel“) übersprungen. Infektionen von Mensch zu Mensch sind bisher nicht bekannt.

Im Frühjahr 2009 wurde erstmals die höchste Pandemiestufe durch die WHO ausgerufen. Ausgelöst wurde diese durch eine Reassortante eines H1N1 Virus, welches Gene von mehreren Schweineinfluenza Stämmen besitzt (Zimmer & Burke, 2009). In den späten 1990er Jahren kam es zu einer Reassortierung zwischen einem humanen H3N2 Virus, einem klassischen Schweinevirus (H1N1) und einem nordamerikanischen aviären Influenzavirus (H1N1). Das daraus resultierende Virus zirkulierte in der nordamerikanischen Schweinepopulation bis es zu einer weiteren Reassortierung mit einem eurasischen aviär-ähnlichen Schweinevirus (H1N1) kam. Diese zweite Reassortierung resultierte in dem pandemischen H1N1 Virus von 2009 (Abbildung 1.6) (Neumann *et al.*, 2009; Schnitzler & Schnitzler, 2009). Dieses Virus trägt aviäres PB2 und PA, PB1 von einem humanen H3N2 Virus, HA, NP und NS des klassischen Schweinevirus und NA und M des Eurasischen Schweinevirus. Es wird, anders als H5N1, von Mensch zu Mensch übertragen und breitete sich sehr schnell von Mexiko über die ganze Welt aus.

Einleitung

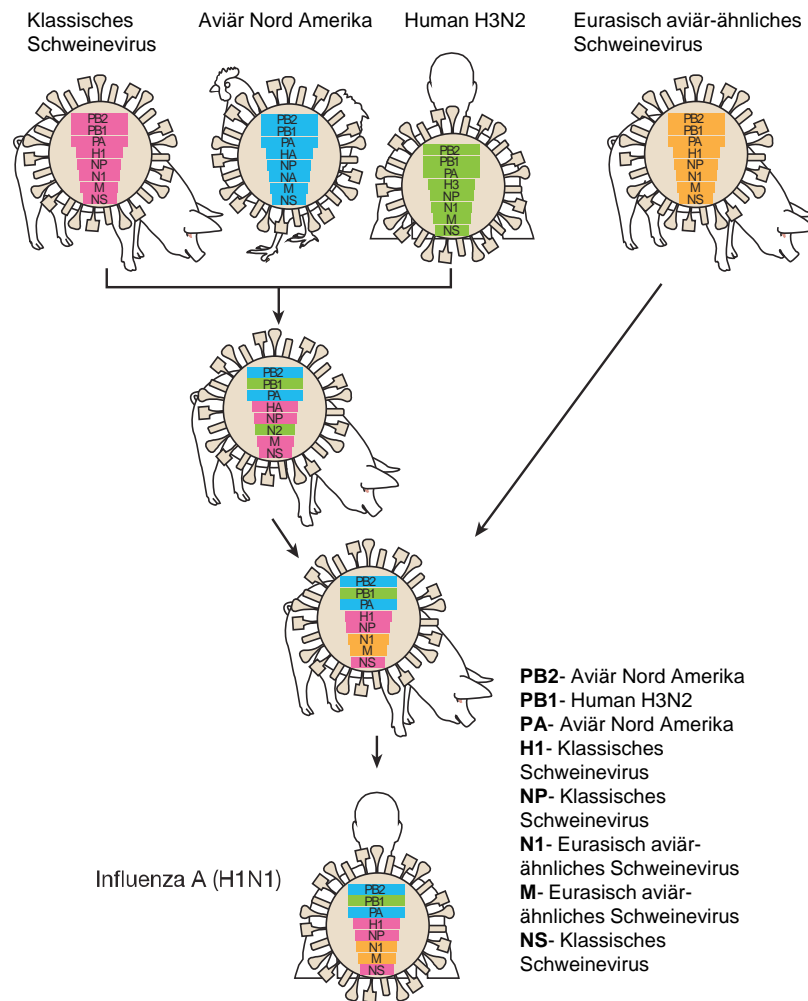


Abbildung 1.6 Schematische Darstellung der Entstehung des H1N1 PandemieVirus.

Adaptiert nach (Neumann *et al.*, 2009)

1.8 Pathogenese und Klinik

Influenzaviren treten auf der ganzen Welt auf, werden aerogen übertragen und infizieren Epithelzellen der Mund-, Nasen- und Rachenschleimhaut. Sie breiten sich von dort im unteren Respirationstrakt bis in die Epithelzellen der Bronchien und Bronchiolen aus. Die Flimmerepithelien und die schleimproduzierenden Hautschichten im Respirationstrakt werden durch das Virus zerstört. T-Zellen, Makrophagen und neutrophile Granulozyten gelangen in die infizierten Bereiche. Zum einen spielen von ihnen sezernierte Zytokine eine Rolle bei der Viruseliminierung und zum anderen sind sie für die systemischen Symptome der Grippe, wie allgemeines Schwäche- und Krankheitsgefühl und Fieber, verantwortlich.

Die Erscheinungen einer Grippeinfektion reichen von asymptomatischen Infektionen bis hin zu respiratorischen Erkrankungen mit systemischen Komplikationen, die die

Einleitung

Lunge, das Herz, die Nieren und Muskeln betreffen und vor allem bei älteren oder immunsuppremierten Personen auftreten. Oft entstehen Lungenentzündungen durch eine sekundäre bakterielle Infektion mit *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus* und *Haemophilus influenzae*. Bakterielle und virale Infektionen scheinen synergistisch zu wirken (Tashiro et al., 1987). Ein Grund dafür könnte die Fähigkeit einiger bakterieller Proteasen sein, das virale Hämagglutinin zu spalten.

Das Krankheitsbild von Influenza ist relativ breit gefächert. Die weltweite Inzidenz der jährlichen Influenza Infektion liegt bei 10 bis 15 % der Bevölkerung. Ein bis drei Tage nach der Ansteckung setzen plötzlich Fieber (bis zu 41°C), Kopf- und Gliederschmerzen, Kältegefühl, Schüttelfrost, Appetitlosigkeit, allgemeines Schwächegefühl, Halsschmerzen und Husten ein. Zudem können Kreislaufstörungen auftreten. Bei Erregern der „neuen Influenza“ (der aktuellsten Pandemie H1N1) kann es auch zu Erbrechen und Durchfall kommen. Bei älteren Menschen, Kindern und immunsuppressiven Patienten kann eine Influenzainfektion tödlich verlaufen, daher wird für solche Risikopersonen (Säuglinge, Senioren oder immunsupprimierte Personen) eine Grippeimpfung empfohlen.

1.9 Impfstoffe und Therapie

Zur Influenza-Therapie beim Menschen sind Medikamente zweier Stoffklassen zugelassen. Es handelt sich zum einen um Hemmer des Membranproteins M2 namens Amantadin (Handelsname Symmetrel® und PK-Merz®) und Rimantadin (Handelsname Flumandine®) und zum anderen um die Neuraminidasehemmer Oseltamivir (Handelsname Tamiflu®) sowie Zanamivir (Handelsname Relenza®). Die M2 Hemmer blockieren die Funktion des M2 Ionenkanals. Daraufhin kann keine Ansäuerung des Virusinneren erfolgen und in der Folge können die viralen RNPs nicht freigesetzt werden. Die Neuraminidasehemmer binden an die Neuraminidase und blockieren das aktive Zentrum. Die Neuraminidase kann dann nur noch sehr eingeschränkt Sialinsäuren von der Zell- und Virusoberfläche abspalten. Diese Medikamente schützen nicht vor einer Infektion, sondern mindern den Verlauf der Infektion.

Eine Impfung ist die effizienteste Methode, sich vor einer Influenzainfektion zu schützen. Die Influenzaviren werden zurzeit standardmäßig in embryonierten Hühnereiern vermehrt. Erste Studien zu einer Grippe-Impfung wurden mit dem Virus A/Puerto Rico/8/34 (H1N1) durchgeführt (Francis & Magill, 1936). Die ersten Influenza-Impf-

Einleitung

stoffe wurden 1940 eingeführt und waren noch sehr unrein, da es sich zum Teil nur um inaktivierte Allantoisflüssigkeit handelte (Stanley, 1944). Der Aufreinigungsprozess wurde seitdem deutlich verbessert, aber trotz vieler neuer Techniken hat sich in der Herstellung des Influenza Impfstoffes wenig geändert.

Die Zerstörung des Viruspartikels und nachfolgende Reinigungsschritte führen zu den sogenannten Subunit Impfstoffen, die aus den Untereinheiten HA und NA der Viren bestehen. Des Weiteren gibt es die Ganzvirusimpfstoffe, bei denen das komplette Virus in inaktivierter Form im Impfstoff vorhanden ist, und die Spaltvirusimpfstoffe, bei denen die Viruspartikel durch geeignete Stoffe aufgespalten werden. Bei letzterem Impfstoff sind kaum mehr Wirtszelllipide im Impfstoff vorhanden, aber neben HA und NA sind noch einige weitere virale Proteine wie das M und NP zu finden.

Die heutigen Influenzaimpfstoffe beinhalten Antigene von drei Virusstämmen, zwei Influenza A Stämmen (H1N1 und H3N2) und einem Influenza B Stamm. Diese werden jährlich anhand von epidemiologischen Daten, sowie Analysen von Virusisolaten, von der WHO ausgewählt (Stohr, 2003;WHO, 2005). Die Virusstämme für die Herstellung eines Impfstoffes sind Reassortanten mit den HA und NA Proteinen der Impfstämme und den übrigen Proteinen eines Donor Virus (Influenza A/Puerto Rico/8/34), das durch jahrelange Passagen auf Hühnereiern an ein Wachstum in Eiern adaptiert ist (Kilbourne, 1969). Diese Reassortanten werden in größeren Mengen hergestellt und als Saatviren bezeichnet.

Die Saatviren werden jeweils einzeln in großen Mengen in embryonalen Hühnereiern herangezogen. Anschließend werden die Viren zu Herstellung von Subunitimpfstoffen in Bruchstücke zerlegt und einer Vielzahl von Reinigungs- und Konzentrierungsschritten unterzogen. Am Ende werden die gereinigten Oberflächenproteine der drei getrennt voneinander verarbeiteten Stämme zu einem Impfstoff zusammengeführt (Gerdil, 2003). Der fertige Impfstoff wird jedes Jahr in klinischen Studien auf seine Wirksamkeit und Verträglichkeit geprüft. Die Zulassung des Impfstoffes erfolgt in Deutschland durch das Paul-Ehrlich-Institut.

Die Herstellung von Impfstoffen in Hühnereiern ist sehr arbeitsintensiv und abhängig von der Verfügbarkeit der Eier. Die Produktionskapazitäten dieser Herstellungsweise können nicht beliebig ausgeweitet werden, und im Falle einer Pandemie kann nicht unmittelbar mit einer vermehrten Impfstoffproduktion reagiert werden (Ulmer *et al.*, 2006). Es besteht zusätzlich die Gefahr, dass aviäre Viren aus den jeweiligen Eiern in die Referenzviren eingebracht werden (Schmitt *et al.*, 2010). Aus diesen Gründen gibt es

Einleitung

Bestrebungen, Influenza-Impfstoff auf andere Weise herzustellen. Ein Versuch ist die rekombinante Herstellung des Glykoproteins HA in einem Baculovirus Expressionssystem (Safdar & Cox, 2007; Treanor *et al.*, 1996; Treanor *et al.*, 2007). Die Herstellung eines auf dem M2-Protein basierenden Impfstoffes wird zurzeit ausgetestet, da das M2 Protein aller Influenza A Viren hochkonserviert ist. So kann ein universeller Impfstoff für alle Influenza A Viren hergestellt werden (Fiers *et al.*, 2004), und es müsste nicht jedes Jahr eine neue Impfung durchgeführt werden (Fiers *et al.*, 2009).

Außerdem gibt es mehrere Hersteller, die mit Zellkulturtechnik Versuche anstellen (Audsley & Tannock, 2004). Um in Zukunft auf den Einsatz von Hühnereiern verzichten zu können, hat Novartis Vaccines & Diagnostics GmbH den zellbasierten Influenzaimpfstoff OPTAFLU™ entwickelt. Für die Anzucht der Viren wird hier die Suspensionszelllinie MDCK33016 PF verwendet (Gregersen, 2008b). Die Umstellung auf die Zellkulturtechnologie bringt einige Vorteile mit sich. Die Zellen sind immer verfügbar und können je nach Bedarf, zum Beispiel im Fall einer Pandemie, aufgetaut und vermehrt werden. Durch die Anzucht der Saatviren in den verwendeten Säugerzellen kommt es nicht zu eispezifischen Veränderungen in den Aminosäuresequenzen oder Glykosylierungsmustern (Katz & Webster, 1988). Sogar Menschen mit einer Hühnereiweißallergie können mit dem zellbasierten Impfstoff geimpft werden. Die Vermehrung und Ernte der Saatviren in der Zellkultur stellt einen wesentlich geringeren Arbeitsaufwand dar. Die Aufreinigung der Oberflächenproteine verläuft dagegen analog zum eibasierten Impfstoff. Außerdem bietet die MDCK33016 PF Zelle eine effiziente Barriere für das Wachstum anderer Viren. Damit ist das Viruskontaminationsrisiko deutlich geringer als im Ei (Gregersen, 2008a). Mit dem so hergestellten Impfstoff wurden schon klinische Studien durchgeführt, und es konnte festgestellt werden, dass Optaflu™ eine bessere klinische Wirksamkeit erreichte als eibasierter Influenza-Impfstoff (Frey *et al.*, 2009).

Für einen effektiven Impfstoff ist es außerdem wichtig, dass eine ausreichende Immunantwort mit einem möglichst geringen Einsatz an Antigen erzielt wird. Dies kann im Falle einer Pandemie bedeuten, dass man deutlich mehr Impfstoff in kürzerer Zeit herstellen kann. Um eine stärkere Immunantwort durch den Impfstoff zu erhalten, werden die Impfstoffe mit Adjuvantien (Immunantwortverstärker) versetzt (MF59®, AS03 oder Ampligen®). Ampligen® ist eine synthetische doppelsträngige RNA (polyI:polyC), welches als Toll-like Rezeptor 3 Agonist wirkt (Ichinohe *et al.*, 2009). MF59® (Microfluidized Emulsion) und AS03 (Adjuvanted System 03) sind Adjuvantien auf Squalen Basis. Squalen ist eine Substanz, die in fast allen Lebewesen vorkommt und

Einleitung

hauptsächlich in der Leber produziert wird. Durch MF59 wandern mehr Abwehrzellen (Makrophagen oder Monozyten) an die Injektionsstelle. Auch die Antigenaufnahme durch die Antigenpräsentierenden Zellen (Makrophagen und dendritische Zellen) wird gefördert (Wessling, 2009). Durch diese Mechanismen kommt es zur stärkeren Aktivierung des Immunsystems und sogar einem stärkeren Aufbau eines immunologischen Gedächtnisses. Zusätzlich werden durch den adjuvierten Impfstoff mehr schützende Antikörper gegen Influenzaviren gebildet als mit einem konventionellen Impfstoff (Novartis Pharma Schweiz AG, 2007).

1.10 Zielstellung

Jährlich erkranken mehrere Tausend Menschen an Influenzavirus-Infektionen, wodurch es zu gesundheitlichen Schäden bis hin zum Tod kommen kann. Zusätzlich treten auch wirtschaftliche Schäden auf. Ein wirksamer Schutz gegen eine Infektion ist eine Impfung. Die konventionelle Impfstoffherstellung beruht auf der Vermehrung der Influenzaviren in embryonierten Hühnereiern. Dadurch ist man sehr stark von der Verfügbarkeit der Hühnereier abhängig. Außerdem können sich typische Eimutationen bei mehrmaliger Passage auf Eiern ausbilden (Skehel & Wiley, 2000; Widjaja *et al.*, 2006). Diese Mutationen können die antigentische Eigenschaften der Oberflächenproteine ändern und somit die Wirksamkeit eines Impfstoffs beeinträchtigen. Zusätzlich kann es zu Kontaminationen des Impfstoffs durch aviäre Viren kommen.

Einen großen Vorteil bietet daher der Einsatz von Zellkultur (sowohl Säugerzellen als auch aviäre Zellkulturen). Die Säugerzellkultur kommt dem humanen System sehr nahe. Zusätzlich sind Säugerzellen insbesondere MDCK Zellen deutlich selektiver für Influenzaviren als Eier, so dass es weniger zu Kontaminationen mit anderen Viren kommt (Gregersen, 2008a). Novartis Vaccines & Diagnostics produziert Influenzavirus Impfstoff (Optaflu™) auf Hundenierenzellen (MDCK33016 PF). Es sollten Untersuchungen der Influenzaviren gewachsen auf MDCK33016 PF Zellen im Vergleich zum Hühnerei durchgeführt werden. Des Weiteren sollten Mutationen in den Oberflächenproteinen HA und NA zwischen eigewachsenen und zellgewachsenen Viren untersucht werden, die das Bindungsverhalten, die Aktivität der Proteine und deren Immunogenität beeinflussen können. Eine veränderte Immunogenität ist für einen Impfstoff von Nachteil, da eventuell schlechter bis verminderter oder im extremen Fall kein Schutz gegen Influenzaviren mehr aufgebaut werden kann.

Einleitung

Zum Anderen sollte ein potentieller neuer Virusstamm etabliert werden, welcher als Ersatz für den Laborstamm Influenza A/Puerto Rico/8/34 bei einer Reassortierung verwendet werden kann. Zurzeit wird für die Influenzavirus Reassortierung das eiadaptierte Virus A/Puerto Rico/8/34 verwendet. Dieses wächst besonders gut auf Hühnereier und deshalb für die Herstellung von Reassortanten für Eier etabliert. Auf der MDCK Zelle haben Influenzavirus Reassortanten mit diesem Donor oft ein eingeschränktes Wachstum, was für die Produktion von Saatvirus auf der MDCK33016 PF Zelle von Nachteil ist. Um einen Stamm zu etablieren, welcher sehr gut auf der MDCK33016 PF Zelle wächst, sollte ein Virusisolat nur auf dieser Zelle isoliert und durch mehrmaliges Passagieren an die Bedingungen adaptiert werden. Damit sollte das Wachstum von Reassortanten mit diesem Donor auf der Zelle deutlich verbessert werden. Somit kann schneller mehr Virus produzieren werden. Der neue Donor NB # 105 (A/New Caledonia/20/99-like) sollte mit A/Puerto Rico/8/34 (New York Medical College) verglichen und die Unterschiede herausgestellt werden. Des Weiteren sollte ein alternatives A/Puerto Rico/8/34 (RKI Berlin) Virus untersucht werden.

Ein Donor geeignet für die Reassortierung sollte ein gutes Wachstum in dem Wirtssystem zeigen. Das Wachstum sollte unabhängig von den beiden Oberflächenproteinen HA und NA optimal sein, so dass Austausch des HA und NA den Reassortanten keinen Wachstumsnachteil bringen. Nur so können gut wachsende Reassortanten mit unterschiedlichen HA und NA Genen produziert werden. Es sollten deswegen rekombinante PR8 NYMC und NB # 105 Viren mit unterschiedlichen HA und NA Genen hergestellt und deren Wachstum auf der MDCK33016 PF Zelle untersucht werden. Auf diese Weise sollte gezeigt werden, wie gut der potentielle Donorstamm NB # 105 mit verschiedenen Oberflächenproteinen im Vergleich zu Reassortanten basierend auf dem PR8 NYMC wächst.

2 Material

2.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Tabelle 2.1 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
2'-(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminsäure (Mu-NANA)	Sigma
2-Propanol	Merck
3'SL (N-[1-(3'- α -Sialyllactosyl)]glycylamid)	Synovo
6'SL (N-[1-(6'- α -Sialyllactosyl)]glycylamid)	Synovo
6'SLN (N-[1-(6'- α -Sialyl-2-deoxy-2-acetyl-amino-lactosyl)]glycylamid)	Synovo
AccuGene RNase-freies Wasser	Lonza
Agarose	Peqlab
Albumin aus Rinderserum (BSA)	Sigma
Avicel® RC581	FMC BioPolymer
bovines Fetuin	Sigma
Bromphenolblau	Aldrich
DTT	Molecula
EDTA	Sigma
Ethidiumbromid	Sigma
Fötales Kälber Serum (FKS)	Biochrom
GelRed™	Biotium
Glycerol	Sigma
Methanol	Merck
Milchpulver	Roth
Mini Complete PIC (Proteaseinhibitor)	Roche
NaCl	Sigma
Natriumdeoxycholat	Sigma
NuPAGE MOPS-SDS Laufpuffer (20x)	Invitrogen
NuPAGE Transfer-Puffer (20x)	Invitrogen
OPD (O-Phenylendiamin)-Tabletten	Sigma
Paraformaldehyd	Roth
PBS-Tabletten	Calbiochem
Ponal-Klebstoff	Henkel

Material

Salzsäure (37 %, rauchend)	Roth
Saponin	Fluka
SDS	Sigma
Biozym Plaque Agarose	Biozym
SigmaFast™ OPD-Tabletten	Sigma
Streptavidin-Peroxidase	Sigma
Tris-HCl	Roth
Triton-X-100	Merck
True Blue™ Peroxidase Substrate	KPL
Trypzean	Sigma
U0126 (1,4-Diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio)butadiene) (MEK1/2 Inhibitor)	Calbiochem
Zanamivir	Synovo

Tabelle 2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
FACS Röhrchen, 5 ml	Sarstedt
6-Loch Platten cellBIND®	Corning
24-Loch Platten cellBIND®	Corning
Glasflaschen 1000 ml, 50 ml, 250 ml, 100 ml	Schott
Multipette, 30-300µl	Eppendorf
PCR Tubes	Eppendorf
Pipetten 1000-100µl, 100-10µl, 10-0,5µl, 2,5-0,1µl	Eppendorf
Pipettenspitzen (mit/ohne Filter)	Eppendorf
Safe-Lock Tubes 2 ml, 1,5 ml, 0,5 ml	Eppendorf
Serologische Pipetten 25 ml, 10 ml, 5 ml, 2 ml	VWR
Mikrotiterplatten	
U-Platten (96-Loch)	Brand
Flachboden schwarz Polystyrol (96-Loch)	Greiner
Blottingpapier MN 218B	Marchery-Nagel
Nitrozellulose Membran Protran®	Whatman®
NuPAGE® Novex Bis Tris Fertiggele 1.0mm x 10, 12 und 15 Kavitäten (5-12 %)	Invitrogen
Falcon, 50 ml	Greiner
Multipipette, 30-300 µl	Eppendorf
Filter Röhrchen 50 Bioreaktor	TPP
Schraubgefäß (2 ml)	StarLab
Zentrifugenröhrchen, 15 ml	VWR

Material

Tabelle 2.3 Geräte

Geräte	Hersteller
Agarosekammer zur Gelelektrophorese	Harnischmacher
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent
Luminometer Centro LB 960	Berthold
Biostad MD (Fermenter)	B.Braun
Brutschränke	
NUAIRE DH Autoflow	IBS Integra Biosciences
Hera cell 240	Thermo
Cellspin	IBS Integra Biosciences
Certomat MO II	Sartorius
Mikrobiologische Sicherheitswerkbank Klasse II HeraSafe	Thermo Scientific
FC500 (Flow Cytometer)	Beckman Coulter
Gefriertruhe (-15°C bis -25°C)	Premium Frost
Gefriertruhe (-80°C)	GPL
Gelbilddrucker	Mitsubishi
Heizblock	Stuart Scientific
Hoefer SemiPhor (Blotapparatur)	Pharmacia Biotech
Inkubator OV3	Biometra
Kühlschrank (+2°C bis +8°C)	Liebherr
Lichtmikroskop	Hund Wetzlar
Mastercycler epgradient S	Eppendorf
Mikrowelle	Privileg, ALASKA
Milli-Q-Anlage Synthesis A10	Millipore
Mini Wippschüttler SSM4	Stuart
PCR Arbeitsstation	Peqlab
pH-Meter LAB860	Schott Instruments
Pipetten (100-1000 µl; 10-100 µl; 0,5-10 µl; 0,1-2,5 µl)	Eppendorf
Pipettus	Hirschmann
PowerEase 500	NOVEX
Proteinkammer für SDS-Gelelektrophorese	Harnischmacher
Qiacube SN4961	Qiagen
Tecan infinite 200 (Fluoreszenzspektrometer)	Tecan
Vacuboy (Absaughilfe)	IBS Integra Biosciences
VacuSafe Comfort	IBS Integra Biosciences

Material

Vi-Cell™XR Cell Viability Analyzer	Beckman Coulter
Voltmeter	
MP-300V (für Agarose-Gele)	Major Science
für SDS-Gele	Harnischmacher
Vortexer	VWR
Waage TE1502S	Sartorius
Wasserbad	GFL
Zentrifugen	
5810	Eppendorf
Tischzentrifuge CT 15 RE	VWR
Tischzentrifuge mini spin	Eppendorf
Mixer 5432	Eppendorf

Tabelle 2.4 Verwendete Kits

Kits	Hersteller
Lipofectamin™ LTX und PLUS™ Reagent	Invitrogen
Dual-Luciferase Reporter Assay Kit	Promega
QIAamp Viral RNA	Qiagen
QIAquick GelExtraktion Kit	Qiagen
Takara One Step RNA RT PCR	Takara Bio Inc.
WesternBreeze® Chromogenic Kit (mouse und rabbit)	Invitrogen
Qiagen OneStep RT-PCR Kit	Qiagen

Tabelle 2.5 Verwendete Marker

Marker	Hersteller
DNA Molekular Weigth Marker VI	Roche
DNA Molekular Weigth Marker X	Roche
Bench Mark Prestained	Invitrogen
Precision Plus Protein Standard, All Blue	Biorad

Material

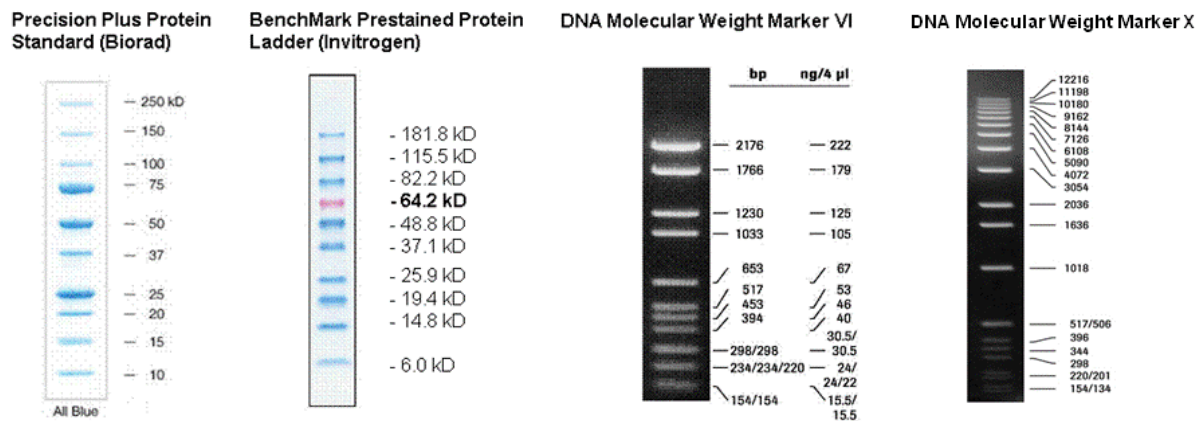


Abbildung 2.1 Verwendete Marker mit den jeweiligen Größenangaben

2.2 Antikörper

Tabelle 2.6 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Influenza Virus A (M&NP), monoclonal mouse, FITC	Oxoid
Influenza Virus B (M&NP), monoclonal mouse, FITC	Oxoid
P44/42 MAPK (Erk 1/2) mouse mAB	Cell Signaling
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) mouse mAB	Cell Signaling
Purified Rabbit anti-Mouse IgG - HRP	Acris Antibodies

2.3 Verwendete Primer

Tabelle 2.7 Primer

Primer	Sequenz
PB2-forward	AGCGAAAGCAGGTCAATTATATT
PB2-S seq	CCAGTTGCAGGTGGAACAAGCAGT
PB2-AS seq	CGGTCATGCTCACCACCACCT
PB2-reverse	AGTAGAAACAAGGTCGTTTTTAA
PB1-forward	AGCGAAAGCAGGCAAACCATTTG
PB1-S seq	CTTGAACAGTCAGGATTTCCAGTTG
PB1-AS seq	GCCATTTGGGCTGTTGCTGGACC
PB1-reverse	AGTAGAAACAAGGCATTTTTTCA
PA-forward	AGCGAAAGCAGGTACTGATC

Material

PA-S seq	GAGGACCCAAGTCATGAAGGAGAGG
PA-AS seq	TGAATCAGTCAGCTCGCATGCCTTG
PA-reverse	AGTAGAAACAAGGTACTTTTTTG
HA-forward	GCTAATACGACTCACTATAAGCAAAAGCAGGGG
HA-reverse	CGCACCTGCGATCAGTAGAAACAAGGGTGTTTT
NA-forward	GCTAATACGACTCACTATAAGCAAAAGCAGGAGT
NA-reverse	CGCACCTGCGATCAGTAGAAACAAGGAGTTTTTT
M-forward	GCGTTAACAGGTAGATATTGAAAGA
M-reverse	TTTACTCCAGCTCTATGCTGACA
NS-forward	AGCAAAAGCAGGGTGACAAAAA
NS-reverse	AGTAGAAACAAGGGTGTTTTTT
NP-forward	AGCAAAAGCAGGGTAGATAAT
NP-reverse	AGTAGAAACAAGGGTATTTTT
FluB-Uni-HA#1 - forward	AGCAGAAGCAGAGCATTTTCTAATATC
FluB-Uni-HA#3 - reverse	GACAACAAGCAAACAAGCACTAC
HA-FluB-820fo - forward	CTGGGAAAACAGGAAC
HA-FluB-1010re - reverse	GGGCAATTCCTATGGC
FluB-Uni-NA#2 - forward	AGCAGAAGCAGAGCA
FluB-Uni-NA#1 - reverse	AGTAGTAACAAGAGCATTTT
NA-FluB-492fo - forward	GAGGAGACAGAAACAAGCTGAGGC
NA-FluB-892re - reverse	CCGCATGTGCATTCCTCAGTGTG

Die Primer wurden für die Amplifizierung der viralen RNA eingesetzt und dienten ebenfalls als Sequenzierprimer. Die Basenfolge der Primer wurde abgeleitet von der Gensequenz des Influenza A/Puerto Rico/8/34. Alle Primer liegen im 5' bzw. 3' untranslatierten Bereich. Die Primer mit dem Zusatz S und AS wurden aus bereits bekannten Sequenzen des Virus NB # 105 konstruiert. Die Orientierung der Primer ist in 5'-3' Richtung angegeben.

2.4 Verwendete Plasmide

Tabelle 2.8 Plasmide

Plasmidname
pKS10 PR8 NP
pKS10 PR8 PB1
pKS10 PR8 PB2
pKS10 PR8 PA
pKS10 PR8 M
pKS10 PR8 NS
pKS10 PR8 HA
pKS10 PR8 NA
pKS10 105 p30 NP
pKS10 105 p30 PB1
pKS10 105 p30 PB2
pKS10 105 p30 PA
pKS10 105 p30 M
pKS10 105 p30 NS
pKS10 105 p30 HA
pKS10 105 p30 NA
pKS10 A/California/07/09 HA
pKS10 A/California/07/09 NA
pKS10 A/Uruguay/716/07 HA
pKS10 A/Uruguay/716/07 NA
hPol-Luc3 (Firefly)
pGL 4.73 pHrhe/SV40 (Renilla)

Für die Herstellung der Plasmide wurde der Vektor pKS10 verwendet.

2.5 Das Expressionssystem

In dem Expressionssystem nach Hoffmann (Hoffmann *et al.*, 2000) wird die virale cDNA zwischen der humanen RNA-Polymerase-I-Promoter- und Maus-Terminatorsequenz inseriert. Die gesamte Polymerase I Transkriptionseinheit ist von einem Cytomegalievirus-Polymerase-II-Promoter und der Polyadenylierungsstelle des Genes

Material

des bovinen Wachstumshormones flankiert. Die gegensätzliche Orientierung der zwei Transkriptionseinheiten erlaubt die Synthese von negativ orientierter vRNA und positiv strängiger mRNA von einer viralen cDNA Vorlage. So ist es möglich, durch Transfektion der 8 Plasmide mit den viralen Gensegmenten infektiöse Viruspartikel herzustellen. Jedes Plasmid kodiert für eines der acht Gensegmente der Influenzaviren. Die einzelnen Gene können dabei von beliebigen Influenza A Viren miteinander kombiniert werden.

Ein solches System wurde mit den Genen der Viren A/Puerto Rico/8/34 (NYMC) und dem neuen Donorstamm NB # 105 (A/New Caledonia/20/99-like) der Passage 30 in dem Expressionsvektor pKS10 aufgebaut, der dem Aufbau des pHW2000 Plasmids von Hoffmann entspricht. Dieser Vektor kann auch zur Expression der Virusgene und Virusherstellung direkt in MDCK Zellen genutzt werden (Suphaphiphat et al., 2010).

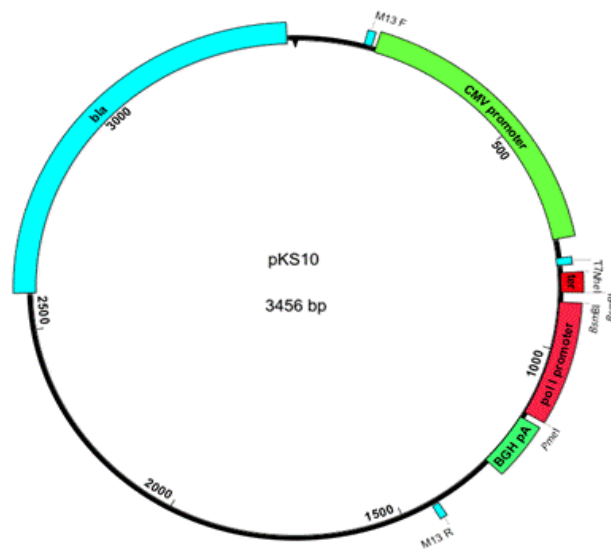


Abbildung 2.2 Vektor pKS 10

(Entwickelt von Konrad Stadtler Novartis Vaccines) humaner Pol (Polymerase) 1 Promotor; CMV: Cytomegalievirus RNA Pol II Promotor; BGH pa: Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormones (bovine growth hormone) Genes; Ter Terminatorsequenz der Maus RNA Polymerase I

2.6 Virusstämme

Für diese Arbeit wurden, neben zwei Varianten des Laborstammes A/Puerto Rico/8/34, Virusstämme verwendet, welche bei der Grippezeit 2007/2008 isoliert wurden. Zusätzlich wurden zwei Saatviren aus der Influenzaimpfstoff-Produktion für Wachstumskurven verwendet.

Material

Tabelle 2.9 Viren

Bezeichnung	Virusstamm	Subtyp
NB # 105	A/New Caledonia/20/99-like	H1N1
PR8 NYMC	A/Puerto Rico/8/34 (New York Medical College)	H1N1
PR8 RKI	A/Puerto Rico/8/34 (RKI Berlin)	H1N1
X179A SSV0906	Saatvirus Reassortante von A/California/07/09 und PR8 NYMC	H1N1
X175A SSV0811	Saatvirus Reassortante von A/Uruguay/716/07 und PR8 NYMC	H3N2
NB # 009	A/Wisconsin/67/2005-like	H3N2
NB # 084	A/Wisconsin/67/2005-like	H3N2
NB # 260	A/Wellington/1/04-like	H3N2
NB # 377	A/Wellington/1/04-like	H3N2
NB # 080	A/NewCaledonia/20/99-like	H1N1
NB # 324	A/NewCaledonia/20/99-like	H1N1
NB # 215	B/Malaysia/2506/04-like	B

2.7 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.10 Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen	Komponenten	Menge
FC-Puffer	FKS in PBS (pH 7,0)	2 %
Fix/Perm	PFA Saponin BSA in PBS (pH 7,0)	4 % 0.5 % 1 %
Ca-TBS-Puffer	NaCl Tris pH 7,0 CaCl ₂	0,85 % 0,02 M 4 mM
Stopp-Puffer	Ethanol Glyzin	25 % 0,1 M
NuPAGE MOPS SDS Running Buffer (1x)	MOPS SDS Running Buffer (20x) Milli-Q-Wasser	50 ml 950 ml

Material

NuPAGE Transfer Buffer (1x)	NuPAGE Transfer Buffer (20x)	100 ml
	Milli-Q-Wasser	1900 ml
DNA-Auftragspuffer (5x)	Glycerol	50 %
	SDS	0,1 %
	Tris, pH 7,5	0,1M
	EDTA	0,1M
	Bromphenolblau	1 Spatelspitze
RIPA Puffer	Tris-HCl pH 7,4	50mM
	Triton-X-100	1 %
	Natriumdeoxycholat	0,25 %
	NaCl	150mM
	EDTA	2mM
	SDS	0,1 %
	Mit Milli-Q-Wasser auf gewünschte Menge auffüllen	
Laemmli Puffer (4x)	Tris-HCl pH 6,8	250mM
	SDS	8 %
	Glycerol	40 %
	DTT	200mM
	Bromphenolblau	1 Spatelspitze
	Mit Milli-Q-Wasser auf gewünschte Menge auffüllen	
Waschpuffer (Rezeptorbinung)	Tween 20	0,01 %
	NA-Inhibitor	0,5 µM
	0,2x PBS	
Reaktionspuffer (Rezeptorbindung)	BSA	0,02 %
	Tween 20	0,02 %
	NA-Inhibitor	1 µM
	0,2x PBS	

2.8 Zellen und Medium

2.8.1 Die MDCK Zelle

Die MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) Zelle wurde von S. H. Madin und N. B. Darby 1958 aus der Niere eines Cocker Spaniels isoliert (Madin et al. 1958). Diese Zelllinie gilt als sehr robust, das heißt sie lässt sich sehr einfach und schnell kultivieren und wächst normalerweise adhärent als Monolayer. Sie ist für verschiedenste Virentypen empfänglich und ermöglicht deren Vermehrung. Sie wird schon seit den späten 1970er

Material

Jahren für die Isolation von Influenzaviren verwendet (Meguro *et al.*, 1979). In dieser Arbeit wurde mit einer Zelllinie (MDCK33016 PF) gearbeitet, die in Suspension wachsen kann, da deren adhärenz Fähigkeit stark eingeschränkt ist. Dies wurde dadurch erreicht, dass sie an serum- und proteinfreies chemisch definiertes Medium adaptiert wurde. Dadurch wurde eine einfache Kultivierung in großem Maßstab ermöglicht (Fermenter). Die MDCK33016 PF Zelllinie eignet sich so zur industriellen Verwendung.

2.8.2 Zellkulturmedium

Zur Kultivierung der Zellen wurde das 33016 MDCK CDM Medium verwendet. Es handelt sich um ein chemisch definiertes Medium, welches auf einer firmeninternen Medienformulierung basiert und von der Firma Lonza nach der SOP 104368 hergestellt wird. Zur Infektion wurde zusätzlich proteinfreies Medium 33016 MDCK PFM genutzt. Dieses Medium wird von der Firma Invitrogen nach der SOP 104369 hergestellt. Es können zur Wahrung der Firmengeheimnisse keine näheren Angaben zur Zusammensetzung erfolgen.

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die Zellanzucht erfolgte in einem Fermentersystem Biostad MD (B. Braun). Das Zellwachstum wurde regelmäßig durch eine Zellzählung (Vi-Cell™XR) überprüft und die Zellen mit frischem Medium ausverdünnt. Die Wachstumstemperatur der Zellen betrug 37°C bei einer Rührergeschwindigkeit von 100rpm, pH 7,10 und pO₂ 50 %.

Des Weiteren wurden Zellen in einem Spinnersystem vermehrt. In diesem wurden die Zellen mit 45rpm in einem Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Diese Inkubation erfolgt in speziellen Glasflaschen, die ein Magnetpendel besitzen, welches die Zellsuspension kontinuierlich rührt und so ein Absetzen der Zellen verhindert und gleichzeitig den Gasaustausch unterstützt.

3.2 Virusanzucht

3.2.1 Virusanzucht im Hühnerei

Um Influenza A Viren zu vermehren, wurden elf Tage alte, embryonierte Hühnereier verwendet. In der Chorioallantoismembran der Hühnereier können sich Influenzaviren im Allgemeinen sehr gut vermehren.

Durchführung:

Vor Beginn der Infektion wurden die Eier mit einer Handlampe durchleuchtet um festzustellen, ob die Eier befruchtet sind. Anschließend wurden sie an ihrem stumpfen Ende mit Mikrozid desinfiziert und dort angebohrt. Mit einer Kanüle (0,55x25 mm) wurde 0,2 ml einer Virusverdünnung injiziert. Die Kanüle sollte vollständig und senkrecht eingeführt werden, um die Allantoishöhle zu erreichen. Das Loch wurde mit Ponal-Klebstoff (Fa. Henkel) verschlossen. Die infizierten Eier wurden 48 oder 72 Stunden im Brutschrank bei 34°C inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Eier bei 4°C mindestens 4 h am besten aber über Nacht gekühlt, damit sich die Blutgefäße des Embryos zusammenziehen können und ein blutfreies Abnehmen der Allantoisflüssigkeit möglich wird. Um die Allantoisflüssigkeit zu entnehmen, wurde die Eischale im Bereich

Methoden

der Luftblase entfernt und mit einer Einweg-Plastikpipette die Flüssigkeit abgenommen. Der Virustiter wurde durch einen HA-Test (siehe 3.4) bestimmt. Die Allantoisflüssigkeit, welche bei der höchsten Verdünnung noch einen hohen HA-Titer erreicht, wurde für weitere Passagen verwendet, da dort am wenigsten DIPs („defective interfering particles“) vorhanden sind. DIPs sind nicht replikationskompetente Viren, deren Gen-segmenten Teile der kodierenden Sequenzen fehlen.

3.2.2 Virusanzucht in der Zellkultur

Durchführung:

Die MDCK33016 PF Zellen wurden steril aus einem Fermenter entnommen und die Zellzahl bestimmt (Vi-CELL™XR). Anschließend wurden, abhängig von der erreichten Zellzahl, die benötigten Zellen (1×10^6 Zellen/ml) bei 3000 rpm für 5 Minuten abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 70 % PFM (Proteinfreies Medium), 30 % konditioniertem CDM und 1,5 U/ml Trypzean resuspendiert und in ein 50 ml Filterröhrchen überführt. Das konditionierte CDM ist Medium, in welchem die Zellen schon zuvor gewachsen sind. Die Zellen haben in diesen Medium Stoffe abgegeben, die wachstumsfördernd sein können.

Die Viren wurden in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt oder die Menge der benötigten Viruspartikel über die „multiplicity of infection“ (MOI) eingestellt. Hierbei handelt es sich um die Anzahl der Viruspartikel pro Zelle. Anhand des gegebenen Virus-titers wird die Virusprobe bei Bedarf mit PFM verdünnt und dann direkt eingesetzt.

Beispiel zur MOI Berechnung

$$\text{MOI} = \frac{\text{Titer} \times \text{Virusmenge(ml)}}{Z \times V}$$

Z: eingesetzte Zellzahl; V: Volumen des Ansatzes in ml

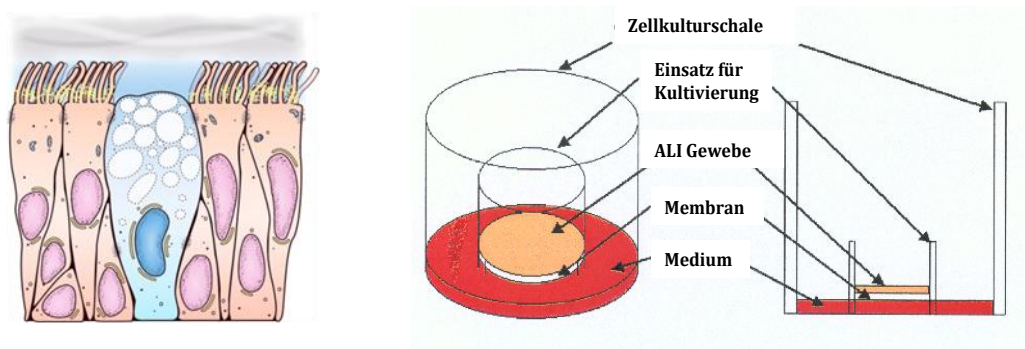
Als Referenz wurden bei jeder Infektion uninfizierte Zellen mitgeführt. Dies ermöglicht einen Vergleich und gewährleistet, dass die detektierten Effekte auf die Infektion zurück zu führen sind. Die Filterröhrchen wurden mit dem Ceromat MO II (Sartorius) bei 200 rpm und 34°C geschüttelt.

Methoden

Bei der Infektion mit Inhibitoren wurden diese 30 Minuten vor der Infektion und nochmals 8 Stunden nach Infektion (hpi: hours post infection) in definierter Menge zu den Zellen gegeben, um kontinuierliche Inhibition der Proteine zu gewährleisten.

3.2.3 Virusanzucht in Humanen Bronchialen Epithelzellen (HBEC)

Humane Bronchiale Epithelzellen wurden in speziellen Platten (Abbildung 3.1) mehrere Wochen angezogen, so dass sie sich ausdifferenzieren können. Hierbei bilden sich zilierte und nicht-zilierte Zellen, die sich wie Zellen der humanen Bronchien verhalten (Abbildung 3.1). Die ausdifferenzierten Zellen wurden mit Influenzaviren am Novartis Institute for Biomedical Research (NIBR) mit einer MOI von 10^{-4} infiziert. Der Überstand wurde mittels des Fokus Tests in Marburg titriert. Die untersuchten Influenzaviren waren zuvor entweder nur auf der MDCK33016 Zelle oder fünf Mal auf Eiern passagiert.



**Abbildung 3.1 Schematische Darstellung einer bronchialen Zellschicht (links).
Der Aufbau einer Zellkulturplatte für Bronchialzellen (rechts).**

Links: Man erkennt die zilierten und nicht zilierten Zellen. Auf der Oberfläche sind die Zellen von Mucus bedeckt. Rechts: Die Zellen wachsen auf einer Membran, die nur von unten mit Medium umspült wird und somit die Bedingungen im Bronchialtrakt nachstellt.

3.3 Virusherstellung mittels viraler cDNA („Rescue“)

Reverse Genetik Studien mit Influenzaviren erfolgten bei dieser Arbeit nach der Methode von Hoffmann siehe auch Abbildung 3.2. Hierbei können Influenzaviren aus 8 Plasmiden, die jeweils unter der Kontrolle eines Pol I- und Pol II-Promotors stehen, hergestellt werden.

Zunächst wurden MDCK33016 PF Zellen mit je 8 Plasmiden (jeweils für jedes Gen-segment ein Plasmid) transfiziert. Von den Plasmiden wurden mRNAs und Proteine, sowie vRNA der Viren synthetisiert. Die viralen Partikel assemblieren und werden

Methoden

schließlich von den Zellen freigesetzt. Ein Teil des Überstandes wurde wiederum auf MDCK33016 PF Zellen gegeben. Weitere 48 Stunden nach der Infektion ist in den MDCK33016 PF Zellen ein zytopathischer Effekt (CPE) zu beobachten. Der direkte Virusnachweis erfolgte durch einen HA-Test.

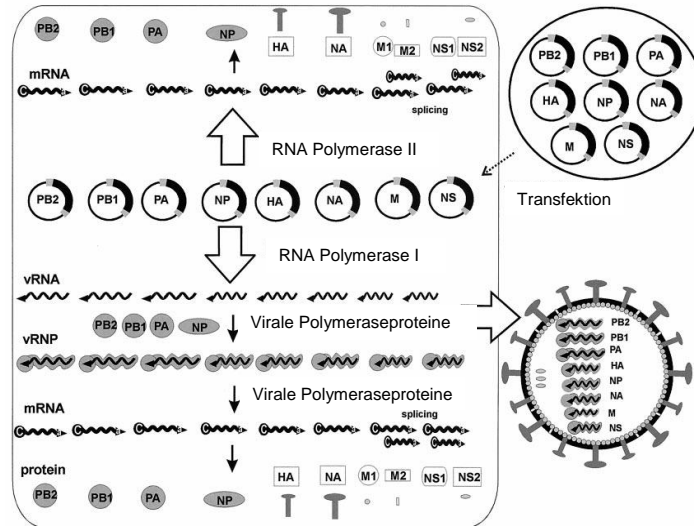


Abbildung 3.2 Plasmidsystem für die Generierung von Influenza Viren.

Durch die gegensätzliche Orientierung der Polymerase I und II Transkriptionseinheiten ist es möglich aus einem cDNA Template vRNA und mRNA zu generieren. Alle 8 Segmente werden in eine Zelle transfiziert um infektiöse Viruspartikel zu erhalten. Adaptiert nach (Hofmann et al 2000)

3.3.1 Transfektion von MDCK33016 PF Zellen

Bei der Transfektion werden Nukleinsäuren, in diesem Fall Plasmide, mittels eines Transfektionsagens in eukaryotische Zellen eingebracht. In dieser Arbeit wurden MDCK33016 PF Zellen verwendet. Als Transfektionsagens wurde Lipofektamine™ LTX (LF LTX) mit PLUS™ Reagenz, eine Mischung kationischer Lipide, benutzt.

Inkubiert man die Plasmide mit LF LTX und PLUS, so bilden sich Micellen, die die Plasmide eingeschlossen haben. Die Micellen können nun die Zellmembran überwinden und so die Plasmide in die Zelle bzw. in den Zellkern transportieren.

Durchführung

Für die Transfektion wurden 24-Loch Platten verwendet, die so ausgesät wurden, dass sie am Tag der Transfektion 80-90 % Konfluenz erreichen. Pro Ansatz wurden jeweils 1 µg Plasmid DNA in 100 µl PFM gemischt und mit 2 µl PLUS Reagenz 5 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 5 µl LF LTX zu dem Gemisch gegeben und

Methoden

diese Mischung für 30 min RT inkubiert. Von dieser Mischung wurden ca. 100 µl langsam zu den Zellen gegeben und vorsichtig geschwenkt. Nach der Inkubationszeit von 24h wurden frische MDCK33016 PF Zellen in PFM/1500U/ml Trypzean auf die bereits adhären Zellen gegeben. 72hpi wurde der zellfreie Überstand im HA-Test untersucht, aliquotiert und titriert.

3.4 Hämagglutinationstest (HA-Test)

Auf der Oberfläche von Influenzaviren befindet sich das Oberflächenglykoprotein, das Hämagglutinin. Es verleiht ihnen die Fähigkeit, an endständige Neuraminsäuren von Hühnererythrozyten zu adsorbieren (Hirst, 1941), wodurch es zu einer Quervernetzung (Hämagglutination) der Erythrozyten kommt. Durch zunehmende Virusverdünnungen bei gleich bleibender Erythrozytenkonzentration lassen sich mittels der Hämagglutination quantitative Aussagen über die Viruskonzentration machen. Membrantrümmer mit Hämagglutinin oder DIP (defekte interferierende Partikel) können aber auch zur Hämagglutination beitragen. Daher kann man keine genaue Unterscheidung zwischen infektiösen und nichtinfektiösen Partikeln treffen.

Durchführung

Es wurden verschiedene Virusverdünnungen (2^{-1} bis 2^{-12}) in eine 96-Loch Mikrotiterplatte mit runden Vertiefungen pipettiert. Dazu wurden in jede Vertiefung à 100 µl PBS vorgelegt, und in die erste Vertiefung 100 µl Virus gegeben. Von diesen 200 µl der ersten Vertiefung ausgehend, wurden je 100 µl in die nächste Vertiefung überführt und gut durchmischt. 100 µl der letzten Vertiefung wurden verworfen. So entsteht eine 1:2 Verdünnungsreihe. Beginnend bei der letzten Vertiefung wurden jeweils 100 µl 0,5 % Meerschweinchen-Erythrozytenlösung in jede Vertiefung pipettiert. Die Platte wurde anschließend für 2h bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit ist eine Agglutination, deutlich durch die gleichmäßige Verteilung der Erythrozyten, zu erkennen. Bei einer Verdünnung, bei welcher die Erythrozyten gleichmäßig verteilt sind, sind genug Viren vorhanden, um die Erythrozyten zu vernetzen. Bei höherer Verdünnung jedoch können die Erythrozyten nicht mehr vernetzt werden und sedimentieren am Boden der Vertiefung, und bilden einen Punkt („Knöpfchen“). Als Hämagglutinationstiter wird der reziproke Wert der Verdünnungsstufe angegeben, bei der gerade noch eine Hämagglutination erfolgt. Dies ist ein Maß für den Virustiter.

Methoden

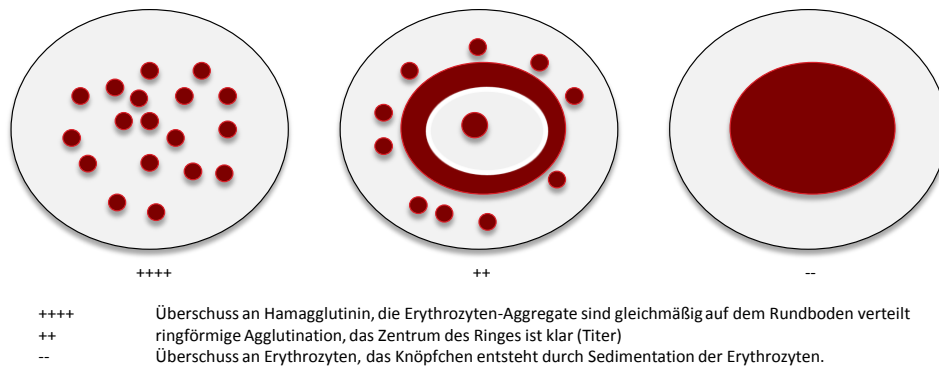


Abbildung 3.3 Darstellung der verschiedenen Agglutinationsstufen.

Bildet sich ein deutliches Knöpfchen, ist der HA-Test negativ, da kein Hämagglutinin(Virus) in der Probe enthalten ist. Bildet sich ein gleichmäßig verteiltes Aggregat, handelt es sich um eine Probe mit deutlichem Hämagglutinin Überschuss. Der Titer entsprach der Stufe, bei der eine leichte Agglutination zu erkennen war (++) .

3.5 Plaquepassagierung

Zur Erhaltung eines Virus, welches ein sehr gutes Wachstum auf MDCK33016 PF Zellen zeigt, wurden mehrere Viren auf diesen Zellen plaquepassagiert. Dies diente zum Einen dazu, die Viren, die am besten auf der Zelle wachsen, zu selektieren, zum Anderen, einen möglichst homogenen Virusüberstand zu erhalten. Idealerweise wird ein Plaque nur von einem Virus gebildet, da die Zellen nach der ersten Infektion von einer festen Agarose-schicht überschichtet werden, welcher die Ausbreitung nur auf die nächste Zelle erlaubt. Es werden immer die Plaques gepickt, die am größten sind, da hier die Viren am schnellsten wachsen. So wird über mehrere Passagen nur die bestwachsende Viruspopulation etabliert.

Durchführung

Für die Plaquepassagierung wurde ein Plaquetest durchgeführt, indem man MDCK33016 PF Zellen mit 0,5 % FBS in CDM einen Tag adhärent konfluent wachsen lässt. Die Zellen wurden am nächsten Tag mit PBS gewaschen und mit verschiedenen Verdünnungen der Viren in 70%PFM/30%CDM mit 1500U/ml Trypzean infiziert. Nach einer Stunde bei 34°C werden die Zellen wiederum mit PBS gewaschen und eine Schicht aus 1 % Agar in PFM/CDM mit 1500U/ml Trypzean auf die Zellen gegeben. Wenn der Agar fest war, wurden die Zellen bei 34°C für 6 Tage inkubiert. So können einzelne Viren nur noch die Nachbarzelle infizieren und es entstehen Zonen toter Zellen (Plaques). Einzelne Plaques wurden aus dem Agar ausgestochen und in PBS über Nacht bei 4°C

Methoden

resuspendiert. Die Viren, die aus dem Agar herausgelöst wurden, wurden für eine weitere Plaquepassage verwendet.

3.6 Titration mittels Durchflusszytometrie

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie können einzelne Zellen gezählt und genauer untersucht werden. Die Zellen werden in dem Durchflusszytometer durch eine Kapillare gesaugt und hydrodynamisch fokussiert. So passieren die Zellen einzeln den Laserstrahl (ein 488-nm Argon-Ionen Laser). Die Zelle emittiert dabei abhängig von ihrer Größe und Granularität Streulicht.

Um spezifische Zellmerkmale im Durchflusszytometer zeigen zu können, bedient man sich einer Vielzahl von Antikörpern. Eine Zelle wird mittels eines spezifischen Antikörpers angefärbt, welcher mit einem Fluorochrom wie z.B. Fluorescein-Isothiocyanat (FITC, grün fluoreszierend) oder Phycoerythrin (PE, rot fluoreszierend) markiert ist. Für intrazelluläre Färbungen ist eine Fixierung und Permeabilisierung der Zellen nötig, damit der Antikörper in die Zelle gelangen kann. Dies wird durch eine Lösung mit Paraformaldehyd und Saponin erreicht. Der gebundene Fluoreszenzfarbstoff wird dann von einem Laser angeregt und strahlt eine bestimmte Wellenlänge wieder ab, welche dann in dem dafür vorgesehenen Kanal erscheint. Da jeder Farbstoff in einen anderen Kanal strahlt, ist auch die Färbung einer Zellpopulation mit mehreren Farbstoffen möglich. Das heißt, man kann mehrere Proteine gleichzeitig färben. In dieser Arbeit wurden nur FITC markierten Antikörpern verwendet.

Durchführung

MDCK33016 PF Zellen (1×10^5 Zellen/ml) wurden mit den zu titrierenden Viren in fünf Verdünnungsstufen infiziert (10^{-1} bis 10^{-5}) und bei 34°C für 6 Stunden inkubiert. Die Infektion wurde wie in 3.2.2 beschrieben, aber ohne Trypzean, angesetzt. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen durch FIX/Perm fixiert und permeabilisiert, um nach einem Waschschrift mit FC-Puffer mit dem jeweiligen Influenza Antikörper gefärbt zu werden. Nach 30 min Inkubation wurden die Zellen mit FC-Puffer gewaschen und im Durchflusszytometer (FC500) gemessen. Die verschiedenen Proben wurden mittels der CXP Software (Beckman Coulter) ausgewertet und die Werte in eine Microsoft® Office Excel Tabelle übertragen. Dort wird mittels der Sperman Kärber Gleichung und einer speziellen Formel der Ausgangstiter der Viruslösung berechnet.

Methoden

Sperman Kärber:

$$D = 10^{\left(\frac{\sum x_i}{100} \right) + 0,5}$$

mit

Σx_i = Summe der prozentual positiv gewerteten Zellen der einzelnen Verdünnungsstufen
0,5 ist ein Korrektionsfaktor

Zur Titerberechnung wird die folgende Formel genutzt.

$$\text{Titer (fluorescent infectious units/ml)} = \frac{C}{2} \times D \times \frac{1}{V}$$

mit

C= Anzahl der für die Infektion eingesetzten Zellen (Zellzahl, die nach der Infektion bestimmt wurde)

D= Verdünnung, bei der 50% der Zellen Influenza positiv sind (durch Sperman Kärber berechnet)

V= für die Infektion eingesetzten Volumen in Milliliter

Zum besseren Abgleich mit anderen Titrationsmethoden wurden die erhaltenen Werte in logarithmierter Form angegeben.

3.7 Titration mittels Fokus Test

Der Fokus Test ist eine weitere Methode, Viren zu titrieren. Diese Methode wurde für Wachstumskurven verwendet, um auch noch sehr niedrige Virustiter erfassen zu können. Bei diesem Test werden adhärent gewachsene Zellen mit den Viren in verschiedenen Verdünnungen infiziert und nach 24 Stunden die infizierten Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Infektion wird durch einen spezifischen Influenza-Antikörper (Oxoid) und einen HRP-markierten Zweitantikörper sichtbar gemacht.

Durchführung:

Einen Tag vor der Titration wurden Zellen in eine 24-Loch Platte in CDM/2 % FBS ausgesät, so dass am nächsten Tag eine Konfluenz von 80-90 % erreicht ist. Am nächsten Tag wurden eine Verdünnungsreihe der Virusproben in kaltem PFM hergestellt (10^{-1} bis 10^{-8}). Die konfluent gewachsenen Zellen wurden zwei Mal mit warmem PFM gewaschen und 250 µl der Virusverdünnung auf die Zellen gegeben. Darauf folgte eine Inkubation

Methoden

von 60 min bei 34°C 5 % CO₂. Während der Inkubationszeit wurde 0.6 % Avicel in PFM+1500 U/ml Trypzean hergestellt und im Wasserbad warmgehalten.

Die Zellen wurden nach der Stunde einmal mit warmen PFM gewaschen und 500 µl 0.6 % Avicel in PFM pro Loch aufgetragen. Die Platten wurden ohne weitere Erschütterung für 24h bei 34°C, 5 % CO₂ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Platten kurz geschwenkt und der Avicel Überstand abgesaugt. Die Zellen wurden vorsichtig einmal mit PBS/0,1%Tween20 gewaschen und mit 500 µl Fix/Perm für 30 min 4°C fixiert und permeabilisiert. Nach zwei weiteren Waschschritten mit PBS/0,1%Tween20 wurden die Zellen mit den jeweiligen Influenza Antikörpern (1:500 in PBS/1 % Milchpulver) für 30 min RT inkubiert. Darauf folgten drei Waschschrritte mit PBS/0,1%Tween20 und die Inkubation mit einem Anti-Mouse (HRP) Antikörper (60 min RT). Die Färbung wurde nach nochmaligem Waschen mit PBS/0,1%Tween20 durch 100 µl TrueBlue Peroxidase Substrat sichtbar gemacht. Nach ausreichender Färbung wurden die Platten mit Wasser gewaschen und zum Trocknen aufgestellt. Die gefärbten Zellen (Plaques) wurden ausgezählt und der Titer berechnet.

3.8 MuNANA Test

Zum Nachweis der Neuraminidaseaktivität der verschiedenen Viren wurde der MuNANA Test durchgeführt. Das Prinzip des Tests beruht auf der enzymatischen Spaltung des Substrates 2'(4-Methylumbelliferyl)- α -D-N-acetylneuraminsäure (Mu-NANA) durch die Neuraminidase. Das Fluorophor Methylumbelliferon (Mu) wird durch die Neuraminidase von der Sialinsäure (NANA) abgespalten, dadurch kann ersteres seine Eigenfluoreszenz entfalten und in einem Fluoreszenzspektrometer nachgewiesen werden. Die Bindung des Mu an NANA verhindert im Vorfeld die Fluoreszenz. Das bedeutet, je höher die Neuraminidaseaktivität umso höher ist auch die Fluoreszenz. Um die Viren auf eine identische Viruskonzentration einzustellen wurde die Anzahl der Viruspartikel mit Hilfe einer quantitativen PCR bestimmt und die Fluoreszenz auf die Anzahl der Viruspartikel bezogen.

Durchführung:

Die Reaktionen wurden in schwarzen 96-well Mikrotiterplatten (NUNC) durchgeführt. Zunächst wurde pro Loch 1 bis 10 µl Virus mittels Ca-TBS-Puffer auf ein Endvolumen von 40 µl verdünnt. Zu jedem Reaktionsansatz wurden 10 µl Mu-NANA (0,2 mM in

Methoden

Ca-TBS, finale Konzentration 0,04 mM) gegeben und die Platte bei 37°C inkubiert. Nach 20 min wurden zu jedem Reaktionsansatz 200 µl Stopp-Puffer gegeben. Die Emission des freigesetzten 4-Methylumbelliferons wurde bei 450nm (365nm Extinktion) in einem Fluoreszenzspektrometer (Tecan Infinite 200 mit der Software i-Control, 1.4.5.0) gemessen. Die Fluoreszenzen wurden auf die Viruspartikelanzahl normalisiert.

3.9 Sequenzierung

3.9.1 RNA Isolierung

Die virale RNA wurde mit dem „QIAamp Viral® RNA Kit“ von Qiagen im QIAcube nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Hierfür wurden 140 µl der des Virusüberstandes in ein 2 ml Röhrchen pipettiert und in den QIAcube gestellt. Das Elutionsvolumen in AW2 Puffer betrug 50 µl. Im Anschluss daran wurde die isolierte RNA bis zur Weiterverarbeitung bei -80°C gelagert.

3.9.2 Reverse Transkription

Zur Amplifikation viraler RNA wurde eine Reverse Transkription und Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) durchgeführt. Hier dient die isolierte virale RNA als Vorlage für die Reverse Transkriptase zur Generierung von cDNA. Die so synthetisierte cDNA wird anschließend wie bei einer Standard PCR in mehrfachen Replikationszyklen amplifiziert.

Die RT-PCR zur Sequenzierung wurde mit dem „TaKaRa One Step RNA PCR Kit“ (Influenza A Viren) oder dem Qiagen One Step RT-PCR Kit (Influenza B Viren) durchgeführt, wobei jeweils die spezifischen Primern der Virusgene eingesetzt wurden (Tabelle 2.7). Die PCR wurde wie in Tabelle 3.1 beschrieben angesetzt. Mit jeder PCR Reaktion wurde eine Negativkontrolle mitgeführt.

Methoden

Tabelle 3.1 Pipettierschema der RT-PCR Reaktion mit dem TaKaRa One Step Kit.

Komponente	Menge (µl)
10x One Step RNA PCR Buffer	5
25 mM MgCl ₂	10
10 mM dNTP	5
RNase Inhibitor (40 units/µl)	1
AVM Rtase XL (5 units/µl)	1
AVM Optimized Taq (5 units/µl)	1
Template RNA	10
Primer rev (10 µM)	1
Primer fwd (10 µM)	1
RNAse freies Wasser ad 50µl	15

Die PCR wurde mit Hilfe des Thermocyclers epgradient S durchgeführt. Die Temperaturprogramme wurden spezifisch für jedes Gen, wie in Tabelle 3.3 angegeben, durchgeführt.

Tabelle 3.2 Standard Profil der RT-PCR mit TaKaRa One Step Kit.

Temperatur (°C)	Zeit	Funktion	
53	30min	Reverse Transkription	
94	2min	Aktivierung der Polymerase	
94	30sec	Denaturierung	} 35x
XX (s Tab. 3.3)	1min	Primerannealing	
70	1min/kb	Elongation	
72	10min	Finale Verlängerung	
4	∞		

Die Zeit der Elongation und die Temperatur des Primerannealings wurden auf das jeweilige Gen abgestimmt(s. Tabelle 3.3).

Methoden

Tabelle 3.3 Spezifische Daten der PCR Zyklen.

Gen	Annealingtemperatur (°C)
M	60
PB-1	58
PB-2	55
PA	53
HA	61
NP	51
NA	61
NS	55

Das PCR-Programm wurde individuell für jedes Gen am Thermocycler eingestellt.
Hierbei ist die Schmelztemperatur abhängig von der Primersequenz.

Tabelle 3.4 Pipettierschema der RT PCR Reaktion mit dem Qiagen OneStep RT-PCR Kit.

Komponente	Menge (µl) HA	Menge (µl) NA
RNA	4	4
Primer rev (20 µM)	1	1
Primer fwd (20 µM)	1	1
dNTPs (10mM)	2	1
5xPuffer	10	10
Enzym-Mix	1,5	1,5
Q-Solution	-	2,5
RNAse freies Wasser ad 50 µl	30,5	29
Gesamtvolumen	50 µl	50 µl

Die Q-Solution in diesem Kit verbesserte das Ergebnis der PCR. Bei NA erzielte dies
deutlichere Banden. Bei HA war die Q-Solution hinderlich.

Methoden

Tabelle 3.5 Standard Profil der RT PCR mit Qiagen OneStep RT-PCR Kit.

Temperatur (°C)	Zeit	Funktion	
50°C	30 min	Reverse Transkription	
95°C	15 min	Aktivierung der HotStarTaq-DNA-Polymerase	
94°C	30 sec	Denaturierung	} 38x
53°C	30 sec	Primerannealing	
72°C	2 min	Elongation	
72°C	10 min	Finale Elongation	
4°C	∞		

Für alle Primer gelten die gleichen Annealing Bedingungen.

3.9.3 Aufreinigung von PCR Produkten aus Agarose-Gelen und Sequenzierung

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA, ihrer Größe entsprechend, entlang eines elektrischen Feldes. Für die Auftrennung wurde ein 1 %igen Agarosegel mit 0,0005 % Ethidiumbromid oder GelRed in TAE Puffer verwendet. Sowohl Ethidiumbromid als auch GelRed lagern sich an der DNA an. Somit kann die DNA später unter UV Licht sichtbar gemacht werden. Als Größenstandard dient der DNA Molekular Weight Marker VI. Die Proben wurden mit DNA Laufpuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Laufzeit des Gels betrug eine Stunde bei 100 V.

Nach der Auftrennung in einem Agarosegel wurde die gewünschte Bande der PCR aufgereinigt um unerwünschte Nebenprodukte auszuschließen. Hierfür wurden die PCR Banden unter eine UV Quelle mit einer Wellenlänge von 366 nm detektiert und mit einem Skalpell herausgeschnitten. Anhand dieser Standards wurde die Produktgröße, welche ausgeschnitten werden sollte, kontrolliert.

Es folgte eine Aufreinigung im QIAcube mit dem QIAquick GelExtraction Kit nach Angaben des Herstellers. Die PCR Produkte wurden von der Firma GENterprise GENOMICS (Standort: Mainz) mit den oben beschriebenen Primern sequenziert. Bei dieser Methode sieht man die Sequenz der am stärksten vertretenen RNA Spezies. In dem Virusüberstand können aber durchaus auch Gene mit einer mutierten Sequenz vorhanden sein, welche allerdings nicht dominant ist. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm Finch TV 4.0 (Geospiza) und Vektor NTI (Invitrogen).

Methoden

3.10 Nachweis von Proteinen im Western Blot

Es wurde untersucht ob Viren während der Infektion bestimmte zelluläre Signalwege anschalten. Dazu wurden MDCK33016 PF Zellen wie oben beschrieben mit einer MOI von 1 infiziert und nach bestimmten Zeitpunkten Proben entnommen. Die 1×10^6 Zellen wurden abzentrifugiert und das Pellet in 200 μ l RIPA Puffer aufgenommen. Kurz vor Verwendung muss der RIPA Puffer mit Proteaseinhibitor versetzt werden. Eine Tablette Proteaseinhibitor (Roche) wurde in 10 ml Puffer gelöst, diese Lösung kann 7 Tage bei 4°C gelagert werden. Zu dem RIPA Puffer wurde 50 μ l 4xLaemmli gegeben. Die Proben wurden anschließend bei 95°C 5 min aufgekocht und entweder sofort aufgetragen oder bei -20°C gelagert.

3.10.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese nach Laemmli werden die Proteine nach ihren molekularen Massen im Polyacrylamidgel aufgetrennt. Es wurden NuPAGE® Novex Bis-Tris Fertiggele der Firma Invitrogen verwendet. Für die Vorbehandlung der Probe wurde diese mit NuPAGE® LDS (Lithium dodecyl sulfate) Sample Buffer (4x) versetzt und für 10min bei 70°C erhitzt, um Sekundär- und Tertiärstrukturen aufzubrechen.

Tabelle 3.6 Zusammensetzung des NuPAGE Geles

NuPAGE® Novex Bis-Tris Gel (5-12 %)
Bis-Tris-HCl Puffer (pH 6,4)
Acrylamid
Bis-acrylamid
Ammoniumpersulfat (APS)
Wasser
Trenngel pH 7,0

Die Gele wurden in eine Elektrophoresekammer eingespannt, die mit 1x NuPAGE® SDS MOPS Running Puffer (Invitrogen) gefüllt wurde. Es wurden 10 μ l Bench Marker™ prestained (Invitrogen) auf das Gel aufgetragen und jeweils 25 μ l der vorbehandelten Proben. Das Gel wird an eine Spannung von 170 V 60 min angeschlossen.

Methoden

3.10.2 Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose-Membranen

Die im SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine werden mittels ElektrobloTTing (Semidry) auf eine Nitrozellulose(NC)-Membran transferiert. Die durch SDS stark negativ geladenen Proteine wandern im elektrischen Feld in Richtung der Anode und binden durch hydrophobe Wechselwirkungen irreversibel an die NC-Membran. Das Filterpapier und die NC-Membran werden vor Gebrauch in NuPAGE Transferpuffer (Invitrogen) getränkt. Es werden über und unter dem Gel und der Membran jeweils 4 Filterpapiere verwendet.

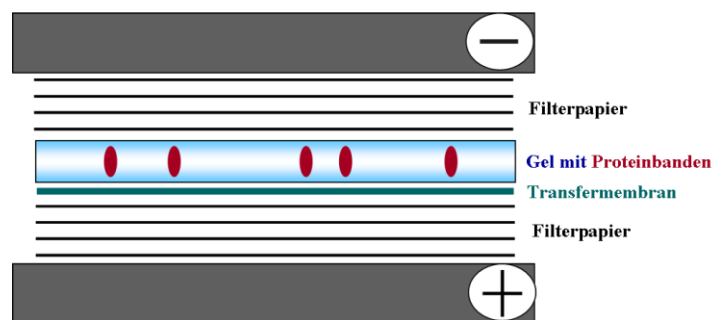


Abbildung 3.4 Schematische Darstellung der Schichtung in der Blotapparatur.

Die Proteine Laufen zur Anode (+).

Aus der Fläche des Gels lässt sich die für den Transfer benötigte Stromstärke berechnen ($1\text{mA}/\text{cm}^2$). Dementsprechend wurde eine zu blottenden Membran 60 min bei 64mA geblottet.

3.10.3 Detektion viraler Proteine mittels des WesternBreeze®Chromogenic Kit

Die Membranen wurden mittels WesternBreeze® Chromogenic Kit von Invitrogen gefärbt, um die geblotteten Proteine sichtbar zu machen. Hierzu wurden die Membranen in 5 ml Blocklösung für 30 min inkubiert. Die Membranen wurden dann zweimal in Milli-Q-Wasser gewaschen und im Anschluss daran für 1,5 Stunden mit dem Primärantikörper Erk oder Phospho Erk (1:1000) inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran mit einer Antikörper-Waschlösung gewaschen und dazugehörigen Zweitantikörper(goat anti-rabbit oder goat anti-mouse) für eine Stunde auf die Membran gegeben. Nach erneutem Waschen wurde dann das Chromogensubstrat hinzugegeben und solange inkubiert, bis Banden sichtbar wurden (10 Minuten–1 Stunde). Danach wurden die Membranen mit Wasser gewaschen und getrocknet.

3.11 Real Time Detektion PCR

Die Real-Time-Detektion-PCR (RTD-PCR) ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerasekettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen während eines PCR-Zyklus durchgeführt und unterscheidet sich somit von anderen quantitativen PCR-Methoden (qPCR), die erst nach der PCR quantitativ ausgewertet werden können. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu, was eine Quantifizierung möglich macht.

Bei der hier genutzten Methode des FRET (fluorescence resonance energy transfer) kommen sogenannte TaqMan®-Sonden zum Einsatz. Diese Sonden sind an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die Taq-Polymerase besitzt neben der Polymerase- auch eine Exonukleaseaktivität. Wird die Sonde während der Synthese des Gegenstrangs am 5'Ende von der Taq-Polymerase abgebaut, entfernen sich Quencher und Fluorophor voneinander. Dies kann durch eine steigende Reporter-Fluoreszenz gemessen werden.

Vor Beginn der RTD-PCR Reaktion muss die entsprechende RNA isoliert werden. Dies erfolgte im QIA Symphony der Firma Qiagen vollautomatisch. Hierzu mussten die Proben entsprechend vorbereitet werden.

Durchführung

Zu Beginn wurden 200µl Zellkulturüberstand bzw. Allantoisflüssigkeit mit einem Mix aus RNase A und T1 behandelt und 1:1000 verdünnt. Die RNase-Behandlung ist für die Entfernung von freier RNA notwendig, die nicht im Viruspartikel gebunden vorliegt. Im Anschluss daran wurden die Proben mit den entsprechenden Reagenzien nach dem Protokoll des Herstellers in das QIA Symphony Gerät gestellt. Hier wurde die RNA in folgenden Schritten extrahiert.

- Lyse der Zellpartikel und der Proteine
- Bindung der RNA an die Oberfläche von Magnetkügelchen
- Waschen
- Elution der RNA unter Entfernung der Magnetkügelchen

Das Elutionsvolumen betrug 60µl. Die Eluate der Proben wurden bis zur Weiterverarbeitung bei -20°C gelagert.

Methoden

Die Proben für die RTD-qPCR wurden wie folgt bearbeitet:

Tabelle 3.7 RTD-PCR-Ansatz

Volumen	Reagenz	Konzentration	Endkonzentration
5,00 µl	Nukleinsäure		
0,20 µl	Primer (InfAM_BR18)	50,0 µM	0,40 µM
0,20 µl	Primer (InfAM_BR11)	50,0 µM	0,40 µM
0,50 µl	SuperScript III RT/Platinum Taq Mix		
12,50 µl	2x Reaction Mix		
0,250 µl	Sonde (InfA_M_TMa)	20,0 µM	0,20 µM
6,350 µl	Wasser		
25,00 µl	Gesamtvolumen		

Im Anschluss daran wurden die Proben im SmartCycler nach dem in Tabelle 3.8 angegebenen Zeitprofil inkubiert.

Tabelle 3.8 Zeitprofil der RTD-PCR

PCR-Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Reverse Transkription	50°C	15min	1
Taq Aktivierung	95°C	2min	1
Denaturierung	94°C	15sec	} 45
Annealing / Elongation	60°C	45sec	

Die Quantifizierung der Proben erfolgt anhand der erhaltenen Ct-(Cycle Threshold) Werte, die in eine Standardgerade eingerechnet werden. Die Standardgerade wird mit Hilfe von in vitro transkribierter RNA generiert, welche definierte RNA Mengen besitzt. Es wird eine Verdünnungsreihe angesetzt, mit 15 Replikaten/Verdünnung. Die erhaltenen Werte werden geblottet und eine Ausgleichsgerade bestimmt. Mit dieser Standardgerade kann man den relativen Gehalt an Virus-RNA im Zellkulturüberstand und der Allantoisflüssigkeit bestimmen.

3.12 Untersuchung der Polymerasekomplexe mit Hilfe des Luciferase Reporterassay

Mit dieser Methode lässt sich die Aktivität des Influenza Polymerasekomplexes in einem in-vitro-System mittels eines Reportergens messen. MDCK33016 PF Zellen wurden mit den Plasmiden kodierend für NP, PA, PB1, PB2 und einem Reporter gen transfiziert. Das Reporter gen (Firefly Luciferase) wird von den Influenza-spezifischen Enden flankiert und steht unter der Kontrolle eines Pol I-Promotors. Nach Transfektion wird im Nukleus der MDCK33016 PF Zellen das Reporter gen von der DNA-abhängigen RNA-Polymerase I erkannt und in virale RNA (vRNA), die in negativer Orientierung vorliegt, umgeschrieben. Die vRNA wird vom PB1-, PB2-, PA-, und NP-Protein zu einem Ribonukleoproteinkomplex (RNP-Komplex) enkapsidiert.

Dieser RNP-Komplex dient dem Polymerasekomplex zur Transkription der vRNA, welches in der Reporter gen-mRNA resultiert. Ob und wie stark der Polymerasekomplex aktiv ist, kann durch indirekte Messung der mRNA über die Detektion des Reportergens, in diesem Fall der Luciferase-Aktivität, gemessen werden.

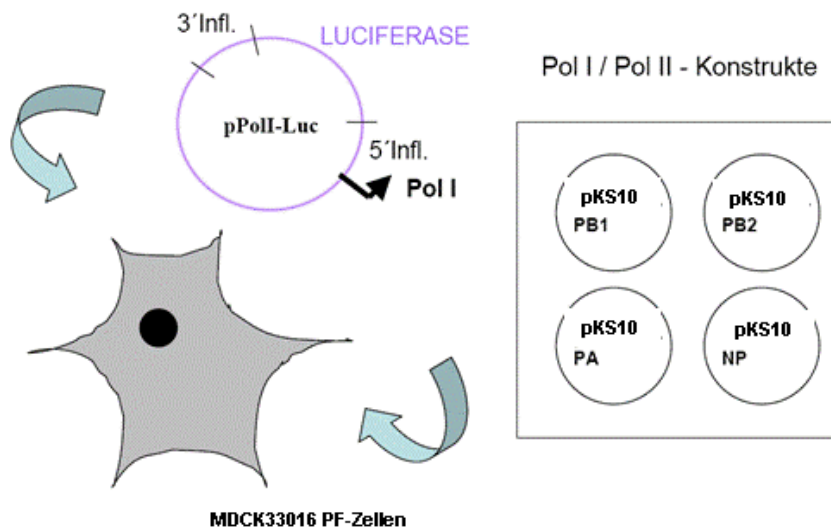


Abbildung 3.5 Schematische Darstellung des Luciferasetest Systems.

Die Standardisierung des Tests erfolgte mit Co-Transfektion des Ansatzes mit der Renilla Luciferase, die unter Kontrolle eines konstitutiv exprimierenden Promotors des SV40 Virus steht und von der eukaryotischen Zelle erkannt wird. Dadurch wird sichergestellt, dass unterschiedliche Transfektionseffizienzen und damit unterschiedliche Proteinmengen ausgeglichen werden.

Methoden

3.12.1 Transfektion und Zelllyse

Die Transfektion erfolgte in 96-Loch Platten, die einen Tag vor der Transfektion mit MDCK33016 PF Zellen auf $1,3 \times 10^4$ Zellen/Loch in CDM/1 % FBS ausgesät wurden. Die Transfektion erfolgte wie in 3.3.1 beschrieben mit 1/5 des jeweiligen Volumens. Da der Renilla Promotor ein sehr starkes Signal ergibt wurde das Renilla Plasmid nur mit 12,5ng eingesetzt. Das Firefly Plasmid wurde in einer Konzentration von 400ng/Ansatz verwendet. Alle anderen Plasmide wurden mit 200ng/Ansatz verwendet. Nach Inkubation der Transfektionsansätze über Nacht wurde der Überstand abgenommen, einmal mit PBS gewaschen und mit 100 µl Passive Lysis Buffer versetzt. Nach 15 min Schütteln sind die Zellen lysiert. 20 µl des Zelllysates wurden im Luciferase Test eingesetzt.

3.12.2 Luciferase Test

In dem Luciferase Test wurden zum Einen das Enzym aus dem Glühwürmchen (*Photinus pyralis*=Firefly) und zum Anderen das der Weichkoralle (*Renilla reniformis* (Seefeder)) verwendet. In der Molekularbiologie wird die Luciferase wegen ihrer hohen Sensitivität häufig bei Promotorstudien als Reporter verwendet. Die Luciferase kann das Substrat Luciferin unter ATP und Mg^{2+} Verbrauch zu Licht umsetzen, welches über einen Luminometer detektiert werden kann.

Die Messung wurde direkt in den 96-Loch Platten mit einem Berthold Luminometer mit zwei Injektoren durchgeführt. Mit dem ersten Injektor wurde 100 µl Luciferase Test Reagenz in jedes Loch gegeben, mit dem Zweiten 100 µl Stop&Glo Reagenz. Zuerst wurden die Proben mit dem Puffer für die Firefly-Luciferase versetzt und gemessen. Daraufhin wird die erste Reaktion abgestoppt und die Messung mit der Renilla-Luciferase in der gleichen Probe durchgeführt.

4 Ergebnisse

4.1 Vergleiche zwischen Ei- und Zellviren

Für die Impfstoffherstellung werden zurzeit hauptsächlich eibasierte Saatviren verwendet. Während der Passagierung im Ei kann es immer wieder zu Mutationen der Oberflächenproteine HA und NA kommen, durch welche die Viren sich an das Wachstum im Ei anpassen. Der Unterschied zwischen Viren, die auf MDCK33016 PF Zellen oder in Eiern vermehrt wurden sollte herausgestellt werden. Dazu wurden H3N2 (A/Wellington/1/04-like und A/Wisconsin/67/2005-like), H1N1 (A/New Caledonia/20/99-like) Viren sowie ein Influenza B (B/Malaysia/2506/04-like) Virus untersucht. Die Viren wurden aus Rachenabstrichen direkt auf der MDCK33016 PF Zelle isoliert und stammen von einer Kooperation mit einem Diagnostiklabor während der Grippesaison 2006/2007 (Trusheim et al, 2007). Die dort isolierten Viren wurden fortlaufend nummeriert und als Novartis Behring (NB) Stämme bezeichnet (z.B. NB # 009). Einige, die auf der MDCK33016 PF Zelle zu hohen Titern gewachsene Viren, wurden für die folgenden Wachstumsversuche in Eiern sowie auf Zellen herangezogen.

4.1.1 Bestimmung der durch Mehrfach-Passagierung entstandenen Mutationen in HA und NA

Eine Auswahl der Viren der oben genannten Studie wurde fünfmal auf MDCK33016 PF Zellen oder in Eiern passagiert. Die Ausgangsviren wurden mit den ei- und zellgewachsenen Viren der fünften Passage verglichen sowie deren Mutationen bestimmt. Alle Mutationen im HA (AS: 183, 186, 187, 190 und 194) liegen im Bereich der Rezeptorbindungsstelle mit dem 130-Loop (AS 134-142), dem 150-Loop (AS 150-156), der 190-Helix (AS 181-193) und dem 220-Loop (AS 220-230) (H3 Nomenklatur) (Skehel & Wiley, 2000). Im NA hingegen wurden keine Veränderungen gefunden. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass Influenzaviren bei Passagierung in Eiern Mutationen entwickeln. Die internen Gene wurden bei diesen Viruspaaren nicht sequenziert.

Ergebnisse

Tabelle 4.1 Mutationen der verschiedenen Viren in Passage 5.

		AS Austausch HA	
H3N2	NB # 009	MDCK	----
		Ei	H183L
	NB # 084	MDCK	----
		Ei	L194P
	NB # 260	MDCK	----
		Ei	G186D D190G
H1N1	NB # 377	MDCK	----
		Ei	L194P
	NB # 080	MDCK	----
		Ei	D187G
	NB # 324	MDCK	----
		Ei	----
B	NB # 215	MDCK	----
		Ei	----

Die RNA der Viren aus Ei und Zelle wurde isoliert und durch die Firma GENTERprise sequenziert. Die Sequenzen der ei- und zellgewachsenen Viren wurden miteinander sowie mit dem jeweiligen Ausgangsvirus (Virus in Patientenprobe) verglichen. Austausche nach Passage fünf sind gezeigt.

4.1.2 Wachstum von ei- und zellgewachsenen Viren auf humanen Bronchialzellen

Aufgrund der Vermehrung in unterschiedlichen Wirtssystemen und den daraus resultierenden Mutationen kann es zu veränderter Rezeptorspezifität und zu verändertem Wachstum der Viren in humanem Gewebe kommen. Um dies zu überprüfen wurden humane Bronchialzellen (HBEC) mit den Viren der Passage 5, vermehrt auf Ei- oder Zellkultur, infiziert und im Anschluss die Titer nach der HBEC Passage miteinander verglichen. Diese Versuche wurden in Cambridge, Massachusetts (USA) im Novartis Institutes for BioMedical Research (NIBR) durchgeführt.

Ergebnisse

Tabelle 4.2 Vergleich des Wachstums der Viren auf HBEC.

		Eivirus	MDCK33016 PF Virus
H3N2	NB # 009	3,14	5,43
	NB # 084	4,08	5,23
	NB # 260	4,96	4,99
	NB # 377	3,12	5,24
H1N1	NB # 080	3,32	4,69
	NB # 324	3,15	4,27
B Stämme	NB # 215	Nicht nachweisbar	2,96

Ausdifferenzierte humane Bronchialzellen wurden mit einer MOI 10^{-4} infiziert und der Überstand nach 48 Stunden titriert.

Zellbasierten Viren zeigen dabei auf HBEC Zellen, bis auf eine Ausnahme, besseres Wachstum als eibasierten Viren. NB # 260 wächst dabei zu gleichen Titern, unabhängig davon in welchem Wirtssystem die Viren vor dem Versuch gewachsen sind. Das eipassagierte Influenza B Virus zeigt keinerlei Wachstum auf HBEC Zellen, allerdings wächst auch das zellgewachsene Virus nicht zu hohen Titern. Auf MDCK33016 PF Zellen gewachsene Viren zeigten auf humanen Bronchialzellen durchgehend besseres Wachstum im Vergleich zu den in Eiern gewachsenen Viren, auch dann wenn keine Veränderungen im HA bei diesen Viren (NB # 324 und NB # 215) gefunden wurden. Die zellgewachsenen Viren entsprechen demnach, auch ohne Mutation der Oberflächenproteine, eher humanen Virusisolaten als eigewachsene Viren, was sich in der Antigenität widerspiegeln kann.

4.1.3 Unterschiede der Neuraminidaseaktivität durch Wachstum in unterschiedlichen Wirtssystemen

Effektives Wachstum eines Virus hängt von der Balance zwischen der NA-Aktivität und der Bindungsfähigkeit des HA ab (Mitnaul *et al.*, 2000). Nur wenn zwischen der Aktivität des NA und der Bindung des HA ein optimales Wechselspiel herrscht, kann eine produktive Infektion stattfinden. Daher wurde untersucht, ob ein Unterschied in der NA-Aktivität zwischen ei- und zellbasierten Viren zu beobachten ist. Zu diesem Zweck wurde der Mu-NANA Test (3.8) durchgeführt, bei welchem ein NA spezifisches Substrat (Methylumbelliferyl-N-acetyl-Neuraminsäure) durch die Neuraminidase gespalten wird. Das freie Methylumbelliferon besitzt eine Autofluoreszenz und kann photometrisch

Ergebnisse

gemessen werden. Die erhaltenen Fluoreszenzen wurden in Bezug auf die Viruspartikelanzahl (3.11) berechnet. Die prozentuale Relation zwischen Ei- und Zellviren wurde gebildet, wobei die Aktivitäten der Eiviren als 100 % angenommen wurden. Die NA-Aktivität war bei den zellbasierten Viren in fast allen Fällen niedriger (Abbildung 4.1). Es konnten nur maximal 69 % der Aktivität des Eivirus erreicht werden. Nur beim B Virus (NB # 215) waren die Aktivitäten der zellbasierten Viren deutlich höher. Hier konnten über 500 % im Vergleich zu den Eiviren gemessen werden. Bei keinem der Viren konnten Unterschiede in der NA-Sequenz gefunden werden. Ein Grund für diese erhöhte NA-Aktivität könnte eine höhere Zahl Neuraminidasen auf der Virusoberfläche sein. Die veränderte Zusammensetzung der Zuckerseitenketten der Virusoberflächenproteine, wie sie in unterschiedlichen Wirtssystemen vorhanden ist, könnte ebenfalls eine veränderte Aktivität der Neuraminidase erklären (Schwarzer *et al.*, 2009).

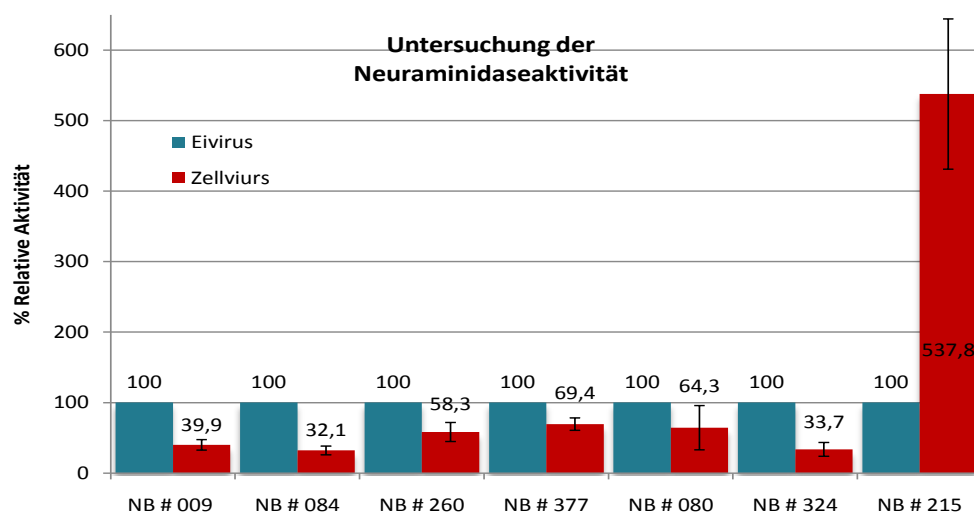


Abbildung 4.1 Relative Neuraminidaseaktivität der zellgewachsenen Viren im Vergleich mit den jeweiligen Eiviren.

In der Passage 5 wurde die Neuraminidaseaktivität der einzelnen Viren in einem Mu-NANA Test untersucht. Die Ergebnisse wurden auf die Anzahl der Viruspartikel bezogen und die Relationen zwischen den einzelnen Paaren berechnet. Das jeweilige Eivirus wurde auf 100 % gesetzt (blaue Balken). Die Proben wurden in fünf Experimenten getestet und Mittelwerte sowie Standardabweichung berechnet (rote Balken).

4.2 Herstellung eines für die MDCK33016 PF Zelle geeigneten Donors

Für die Influenza-Impfstoffherstellung werden jedes Jahr neue Saatviren benötigt, welche eine effiziente Replikation zeigen. Die humanen Influenzaviren, die in der Bevölkerung auftreten, zeigen meist eingeschränktes Wachstum. Daher werden die humanen Wildtyp-Viren mit sogenannten Donorstämmen reassortiert. Das gewünschte

Ergebnisse

Saatvirus soll die internen Gene des Donors enthalten sowie das HA und das NA des Wildtyp-Virus. Dieses Saatvirus sollte dadurch höhere Titer als der Wildtyp zeigen. Für die Reassortierung der Influenzaviren ist es von essentieller Bedeutung sehr gut replizierende Viren als Donor zu verwenden. Derzeit wird das eiadaptierte A/Puerto Rico/8/34 (NYMC) als Donor sowohl für ei- als auch zellbasierte Saatvirusherstellung verwendet. Auf der MDCK33016 PF Zelle zeigen Reassortanten mit diesem Donor allerdings nicht in allen Fällen ein zufriedenstellendes Wachstum, auch der Donor selbst wächst nicht zu hohen Titern auf der Zelle heran. Daher wurden einige saisonale H1N1 und H3N2 Virusisolate von Patientenproben durch Plaquepassagierung aufgereinigt. Viren, welche die größten Plaques zeigten, wurden für weitere Untersuchungen herangezogen. Das Virus NB # 105 (H1N1) zeigte kontinuierlich große Plaques und wurde daher für weitere Plaquepassagen verwendet. NB # 105 wurde im Frühjahr 2007 direkt aus einer klinischen Probe eines influenzaerkrankten Patienten auf der MDCK33016 PF Zelle isoliert. Nach zwei Passagen in MDCK33016 PF Suspensionszellen wurde das Virus durch Plaquepassagierungen aufgereinigt (Abbildung 4.3). Die Viren der letzten Plaquepassage wurden in einer Verdünnungsreihe mit hohen Verdünnungen untersucht, um defekte Partikel zu verdünnen. Von der Verdünnung mit dem höchsten HA-Titer wurde MDCK33016 PF Zellen im Fermentermaßstab infiziert. Dieses Fermentermaterial diente als Ausgangsmaterial für Passage 1 der dreißig Passagen (Abbildung 4.2). Während der gesamten Passagierung wurden verschiedene Testungen der Virussuspension durchgeführt.

Um zu untersuchen, ob NB # 105 schneller als PR8 NYMC zu höheren Titern auf MDCK33016 PF Zellen wächst, wurden im folgenden Wachstumsvergleiche mit PR8 NYMC durchgeführt. Als zusätzlicher Vergleich wurde in den Wachstumskurven eine zu höheren Titern auf der MDCK33016 PF Zelle wachsende Variante des A/Puerto Rico/8/34 (PR8 RKI) verwendet. Des Weiteren wurden rekombinante Viren mit NB # 105 in Passage 30 als Donor hergestellt und diese im Wachstum mit PR8 NYMC und rekombinanten Viren von PR8 NYMC verglichen.

Ergebnisse

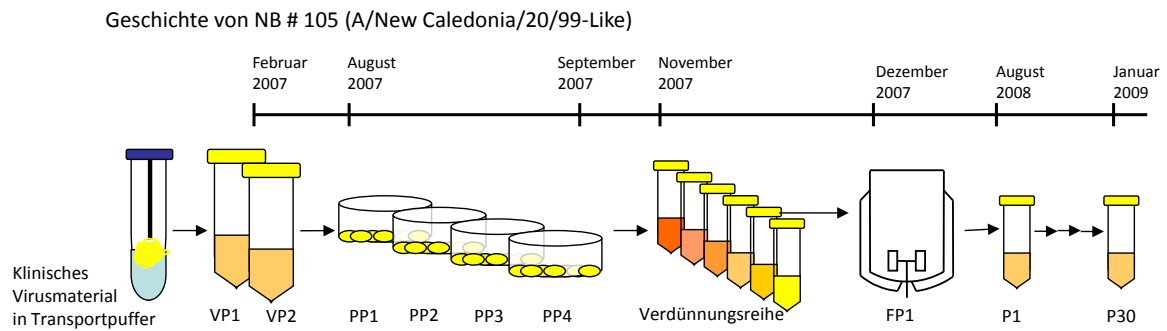


Abbildung 4.2 Historie des Virus NB # 105 von der Isolierung bis zum Donorstamm.

Das Virus NB # 105 wurde aus klinischem Material auf der MDCK33016 PF Zelle in Suspension isoliert und über zwei Passagen vermehrt (VP: Vorpassage). Von dem VP2 Material wurden vier Plaquepassagen (PP) durchgeführt, um das Virus zu klonieren. Nach der vierten PP wurde das Virus mit hohen Verdünnungen infiziert, um defekte Partikel zu beseitigen. Mit der Verdünnung mit dem höchsten HA-Titer wurden MDCK33016 PF Zellen in einem 1L Fermenter infiziert (FP: Fermenterpassage). Mit dem Fermentermaterial wurde die eigentliche Passagierung gestartet (P: Passage). Der Zeitbalken verdeutlicht die zeitliche Abfolge der verschiedenen Passagen.

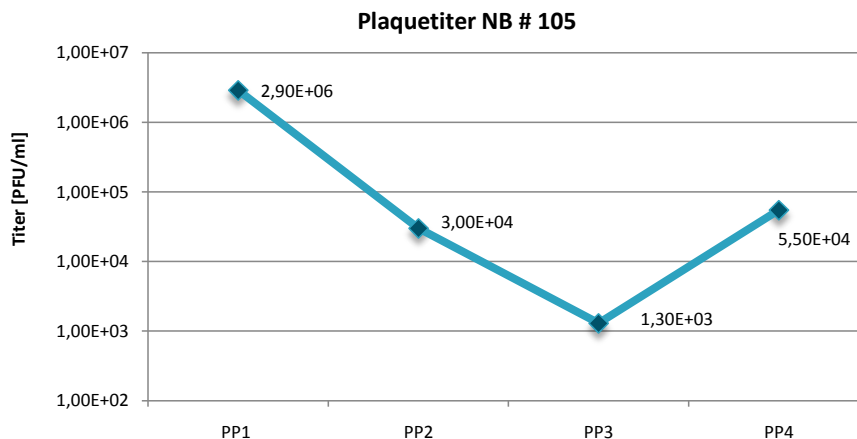


Abbildung 4.3 Wachstumsverhalten des Virus NB # 105 während der Plaquepassagierung.

Das Virus wurde in mehreren Verdünnungsstufen auf adhärenenten MDCK33016 PF Zellen inokuliert. Nach sechs Tagen wurden einige der entstandenen Plaques aus dem Agar ausgestochen und die Viren in PBS gelöst. Diese Viren wurden für die nächste Plaquepassage verwendet. Während der Plaquepassagierung wurde parallel dazu der Titer der Viren abgelesen (PFU: Plaque forming Units). Vor der Plaquepassagierung wurde das Virus aus Patientenmaterial isoliert und zweimal auf der MDCK33016 PF Zelle in Suspension passagiert.

4.2.1 Wachstumskinetiken des Virus NB # 105 während der Passagierung

In der Plaquepassage 4 wurde das Virus mit den besten Wachstumseigenschaften ausgewählt (NB # 105/3) und davon eine Infektion mit hohen Verdünnungen (10^{-5} bis 10^{-10} Endverdünnung) durchgeführt, um defekte Viruspartikel zu entfernen. Ausgehend von dieser Infektion wurden dreißig weitere Passagen mit verschiedenen Verdünnungen durchgeführt, um das Virus an die MDCK33016 PF Zelle zu adaptieren.

Ergebnisse

Hierbei gilt, dass je stabiler dieses Virus auf der MDCK33016 PF Zelle wächst, desto zuverlässiger kann es als Donor eingesetzt werden. Nach jeder fünften Passage wurde RNA isoliert und die viralen Gene sequenziert. Zusätzlich wurden die Viruspartikel mittels RTD-PCR (3.11) und der Titer der Viren mittels Durchflusszytometrie bestimmt (3.6). Des Weiteren wurde ein Mu-NANA Test (3.8) durchgeführt. Nach einigen Passagen wuchs das Virus derart gut, dass eine Ernte schon nach 48 Stunden Infektionszeit ohne Absinken der Titer möglich war (Abbildung 4.4).

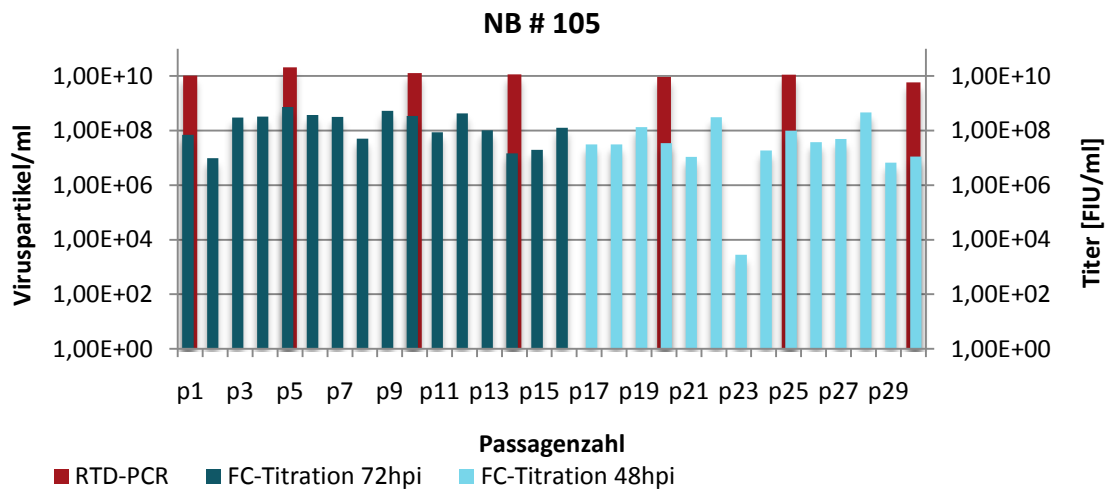


Abbildung 4.4 Titer des Virus NB # 105 während der Passagierung.

Der Titer der Viren wurde mittels Durchflusszytometrie (FC) (3.6) bestimmt (FIU: Fluorescent Infectious Units). Zusätzlich wurde nach jeder fünften Passage die Gesamtviruspartikelanzahl mittels RTD-PCR bestimmt. In dunkelblau sind die Ernten 72hpi, in hellblau 48hpi aufgezeigt. Die roten Balken zeigen die Werte der RTD-PCR in Viruspartikel/ml.

Die Viruspartikelanzahl zeigt in den gemessenen Passagen keinen Unterschied. Die Titer verändern sich kaum zwischen den einzelnen Passagen. In Passage 17 wurden die Viren schon nach 48 Stunden geerntet, es zeigen sich auch dann keine Unterschiede im Titer. Nur in Passage 23 ist ein Abfall des Titers erkennbar, der allerdings in den darauffolgenden Passagen wieder auf das vorherige Maß ansteigt. Das Virus zeigt gleichmäßig hohe Titer, die einen früheren Erntezeitpunkt zulassen. So können schneller große Mengen Virus produziert werden.

4.2.2 Bestimmung, der während der Passagierung entstandenen Mutationen des Virus

NB # 105

Damit sich NB # 105 optimal an die MDCK33016 PF Zelle anpassen kann, wurde es über dreißig Passagen auf diesen Zellen vermehrt. Die Veränderungen des Virus wurden

Ergebnisse

untersucht, indem nach jeder fünften Passage die RNA für eine Sequenzierung isoliert wurde. Die Gene PB2, PB1, NP und NS zeigten keine Mutationen während der gesamten Passagierung. PA, HA, NA und M zeigten, wie in Tabelle 4.3 ersichtlich, einzelne Mutationen. Die veränderten Aminosäuren wurden das erste Mal in den angegebenen Passagen gefunden.

Tabelle 4.3 Auswertung der Mutationen des Virus NB # 105 (H1N1) nach 30 Passagen.

Gen	AS Austausch	Passage Nr.
PB2	-	
PB1	-	
PA	V 91 I	1
	R 185 K	10
HA (H3 Nomenklatur)	D 225 G	5
	T 231 N	1
NP	-	
NA	N 70 H	20
M	R 95 K	5
NS	-	

Die RNA der Viren wurde isoliert und sequenziert. Die Sequenzen wurden mit dem Program Vector NTI® verglichen. Verglichen wurden das Virus direkt nach der letzten Plaquepassagierung (PP4) und die Viren nach jeder fünften Passage.

4.2.3 EM Aufnahmen der untersuchten Viren

Mutationen im M Protein der Influenzaviren können morphologische Änderungen der Viren hervorrufen. Die gefundene Mutation im M Protein (R95K) von NB # 105 könnte die Virenmorphologie von einer hauptsächlich filamentösen zu einer sphärischen Form verändert haben (Bourmakina & Garcia-Sastre, 2003; Burleigh *et al.*, 2005; Elleman & Barclay, 2004). Daher wurden Viren mit einem Saccharosegradienten aufgereinigt und anschließend in einer Ultrazentrifuge pelletiert. Das Viruspellet wurde in PBS/4%PFA aufgenommen und mittels Elektronenmikroskop untersucht. NB # 105 der Passage 1 und der Passage 6 wurden analysiert, da in der fünften Passage zum ersten Mal die Mutation im M Protein auftrat. Des Weiteren wurde PR8 NYMC untersucht, um die Morphologie des NB # 105 mit der eines langjährigen Laborstammes zu vergleichen.

Ergebnisse

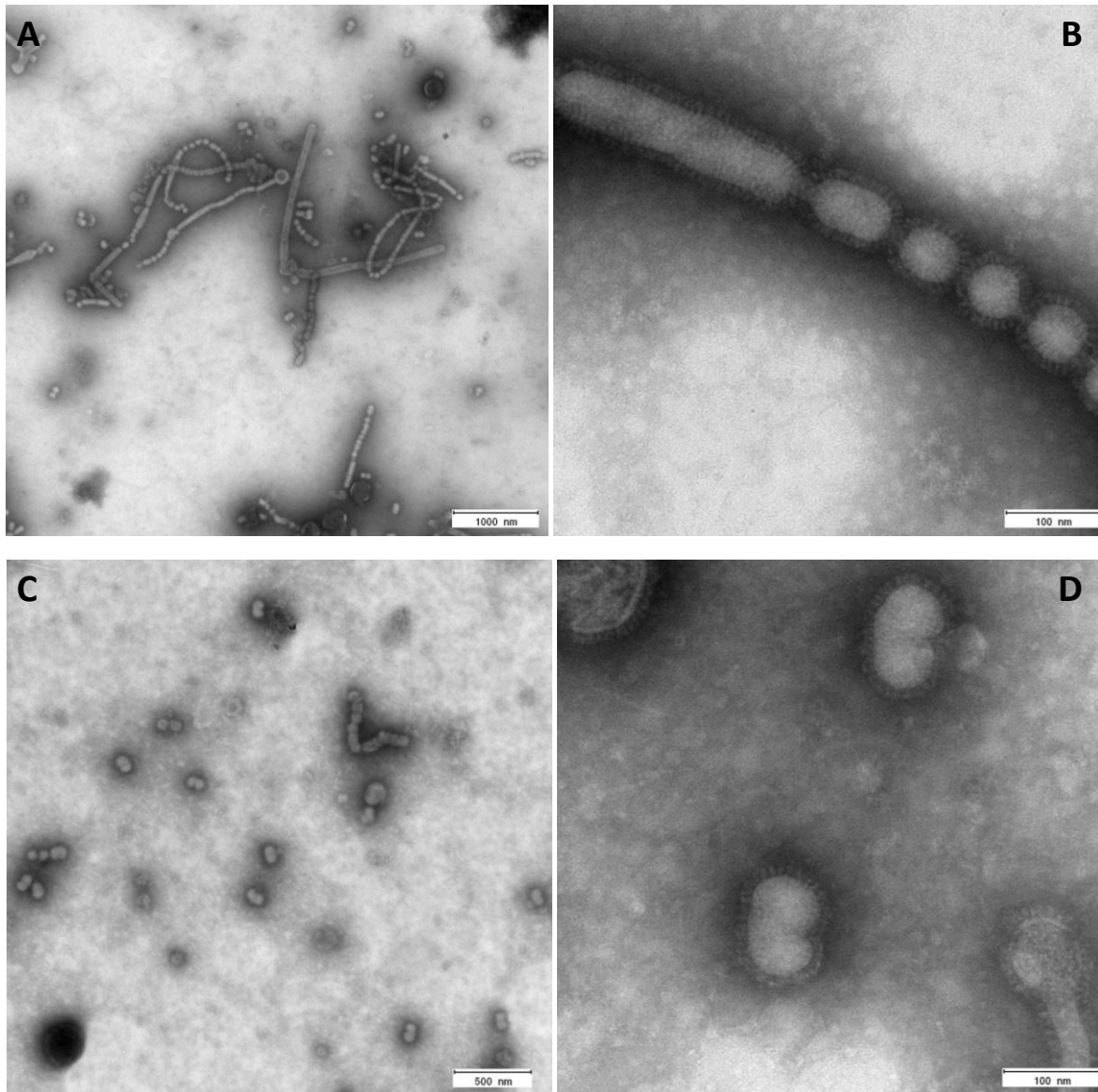


Abbildung 4.5 EM Aufnahmen von NB # 105

Die Viren wurden in der MDCK33016 PF Zelle vermehrt und über einen Saccharosegradienten aufgereinigt. Die pelletierten Viren wurden in PBS mit 4% PFA aufgenommen, auf Netze aufgetragen und mittels EM untersucht. **A** und **B** zeigen die EM Aufnahme des Virus NB # 105 der Passage 1 mit überwiegend filamentösen Partikeln. **A** eine Übersicht, **B** Nahaufnahme eines filamentösen Partikels. **C** und **D** zeigen die Passage 6 mit vorwiegend sphärischen Partikeln. **C** Übersicht, **D** Nahaufnahme eines sphärischen Partikels. In den Nahaufnahmen kann man die Spikes der Partikel erkennen.

Die Mutation des M Proteins von NB # 105 führt zu einer Änderung der Morphologie des Virus, wie man in den EM Aufnahmen erkennen kann. In der Passage 1 sind hauptsächlich filamentöse Partikel, die durchgehend sehr lang (über 1000 nm) sind, vorhanden (Abbildung 4.5 **A**). Teilweise sehen die Partikel wie auf eine Perlenkette aufgereiht aus, die aus einzelnen sphärischen Partikeln zu bestehen scheint. Allerdings sind diese Partikel noch miteinander verbunden. Die Morphologie verändert sich nach Etablierung der Mutation im M Protein (Abbildung 4.5 **C** und **D**) drastisch. In Passage 6

Ergebnisse

ist die Mehrzahl der Partikel sphärisch, nur vereinzelt sind filamentöse Partikel sichtbar, die allerdings deutlich kürzer sind als in Passage 1. Die sphärischen Partikel liegen zum großen Teil einzeln vor, eine Perlenkettenanordnung wie bei Passage 1 ist kaum zu beobachten. Die Partikel der Passage 6 ähneln in der Morphologie denen von PR8 NYMC (Abbildung 4.6). PR8 NYMC zeigt fast ausschließlich sphärische Partikel.

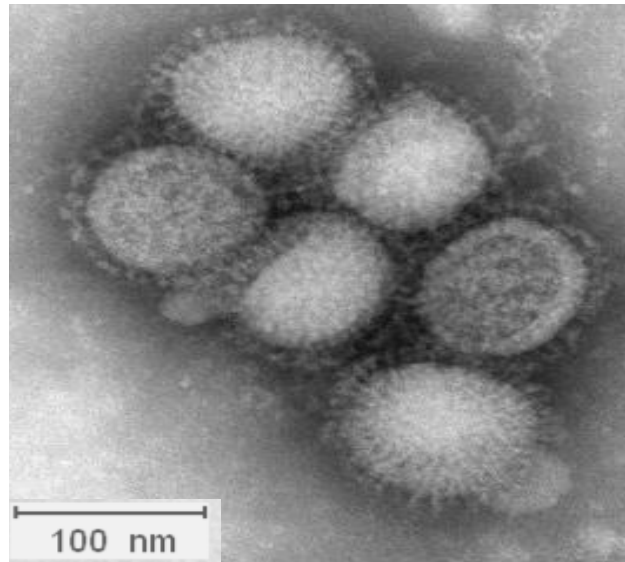


Abbildung 4.6 EM Aufnahme von PR8 NYMC

PR8 NYMC wurde als Vergleichsvirus zu NB # 105 untersucht. Es wurde über einen Saccharosegradienten aufgereinigt und in PBS/4% PFA aufgenommen. In dieser Probe ließen sich nur äußerst vereinzelt filamentöse Partikel finden. Der Großteil der Viren hatte eine sphärische Morphologie.

Die gefundene Morphologie der Viren entspricht den in der Literatur beschriebenen Beobachtungen, dass Viren nach einigen Laborpassagen ihren filamentösen Charakter verlieren.

4.2.4 Neuraminidaseaktivität des Virus NB # 105

Die Neuraminidaseaktivität eines Virus kann dessen Wachstum in verschiedenen Wirtssystemen beeinflussen. Da ab Passage 20 eine Mutation in der Neuraminidase von NB # 105 auftrat, sollte im Folgenden dessen NA-Aktivität untersucht werden. Die Neuraminidaseaktivität jeder fünften Passage wurde bestimmt, und die Aktivität pro Viruspartikel berechnet.

Ergebnisse

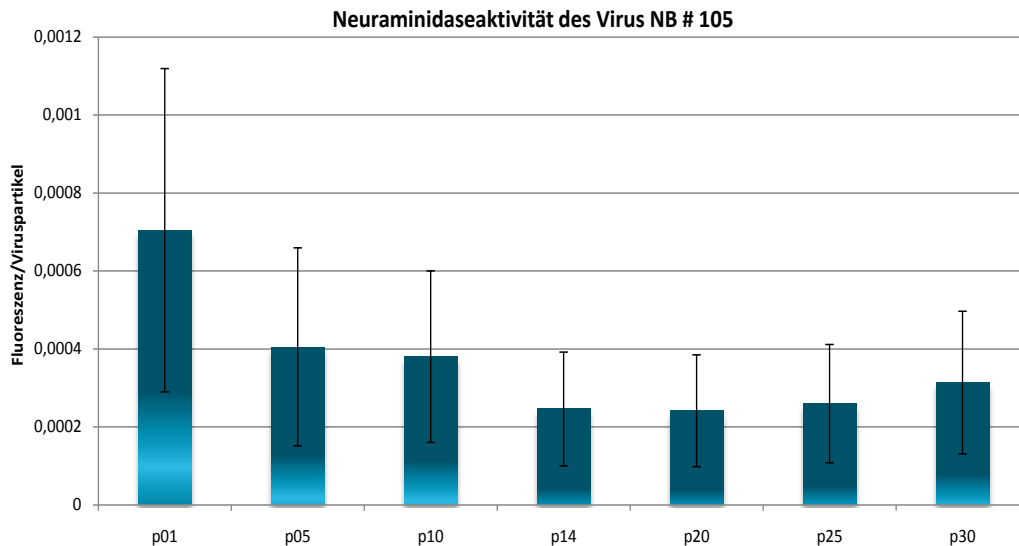


Abbildung 4.7 Neuraminidaseaktivität des Virus NB # 105.

Von jeder fünften Passage wurde die Neuraminidaseaktivität mit dem Mu-NANA Test im Dreifachansatz bestimmt. Die Fluoreszenz wurde auf die Viruspartikelzahl berechnet.

Die Neuraminidaseaktivität pro Viruspartikel nimmt nach der ersten Passage ab und pendelt sich dann auf einem niedrigen Niveau ein (Abbildung 4.7). Bei diesem Test waren hohe Standardabweichungen erkennbar, weswegen Veränderungen der Aktivität schwer nachweisbar sind. In der Neuraminidase kann eine Mutation nach Passage 20 gefunden werden. Da es nach der Passage 20 zu keinen nennenswerten Veränderungen der NA-Aktivität kommt, scheint diese Mutation keine wichtige Rolle für die Aktivität der Neuraminidase zu spielen.

Zusätzlich wurde die NA-Aktivität von PR8 RKI und PR8 NYMC mit NB # 105 verglichen. Alle drei Viren zeigten deutliche Unterschiede in der Neuraminidasesequenz. NA von NB # 105 hatte eine 15 AS längere Stielregion als die beiden PR8 Viren. Des Weiteren unterschieden sich PR8 NYMC und PR8 RKI durch einige Mutationen im NA (A.2). Da beide PR8 Viren und NB # 105 unterschiedliches Wachstum auf der MDCK33016 PF Zelle zeigten, wurde untersucht, ob die Neuraminidaseaktivität dabei eine Rolle spielt. PR8 NYMC zeigte die niedrigste NA-Aktivität, während PR8 RKI die höchste Aktivität zeigte (ungefähr das 10fache von PR8 NYMC). Die NA-Aktivität des NB # 105 lag zwischen der beider PR8 Viren (Abbildung 4.8).

Ergebnisse

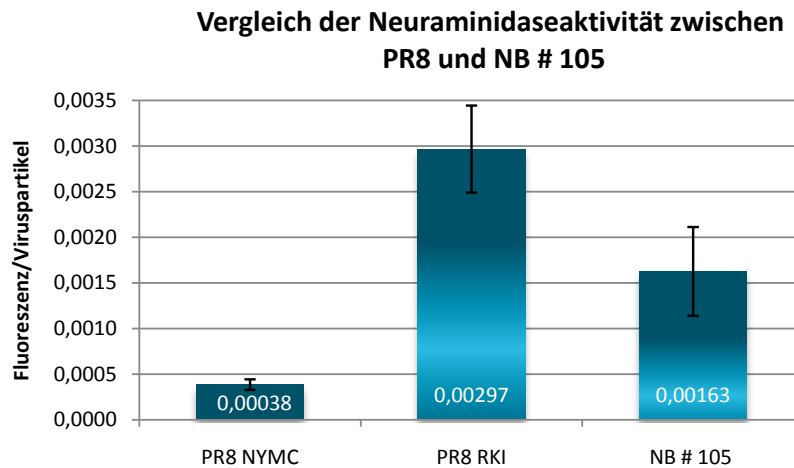


Abbildung 4.8 Vergleich der Neuraminidaseaktivität der Viren PR8 NYMC, PR8 RKI und NB # 105.

MDCK33016 PF Zellen wurden im Vierfachansatz mit PR8 NYMC, PR8 RKI oder NB # 105 in einer $MOI\ 10^{-3}$ infiziert und nach 60 Stunden eine Probe genommen. Die Neuraminidaseaktivität dieser Proben wurde mit dem Mu-NANA-Test bestimmt. Die Fluoreszenz wurde auf die Viruspartikelzahl berechnet.

Die Neuraminidaseaktivitäten alleine lassen keine definitiven Aussagen über einen Einfluss auf das Wachstum der Viren zu. PR8 NYMC wächst am schlechtesten, hat auch die niedrigste NA-Aktivität. NB # 105 zeigt die zweithöchste Aktivität, wächst aber zu höheren Titern als PR8 RKI, welches die höchste NA-Aktivität hat. Für eine definitive Aussage muss das Zusammenspiel der viralen Gene weitergehend untersucht werden.

4.2.5 Wachstumsvergleich von NB # 105 mit A/Puerto Rico/8/34 auf der MDCK33016 PF Zelle

Für die Untersuchungen des Wachstumsverhaltens des Virus NB # 105 wurden zum Vergleich zwei Influenza A/Puerto Rico/8/34 Viren mitgeführt. Sowohl PR8 NYMC, welches ein etabliertes Donorvirus für die Reassortierung von Influenza-Impfstoffstämmen ist, als auch PR8 RKI, welches schneller zu höheren Titern auf der MDCK33016 PF Zelle wächst als PR8 NYMC, wurden dazu verwendet. NB # 105 soll als Donorvirus für zellbasierte Saatviren genutzt werden und dort PR8 NYMC ablösen. Einige Versuche wurden nur im Vergleich mit PR8 NYMC durchgeführt, da dieser Stamm standardmäßig vom New York Medical College, einem von der WHO beauftragtem Labor, für die Reassortierungen von Impfstämmen (eibasiert) verwendet wird. Dieser Stamm ist bestens für das Wachstum auf Eiern geeignet, zeigt aber kein zufriedenstellendes Wachstum auf der MDCK33016 PF Zelle.

Für den Wachstumsvergleich der Viren PR8 NYMC, PR8 RKI und NB # 105 wurden MDCK33016 PF Zellen mit der $MOI\ 10^{-3}$ infiziert und nach 1, 6, 12, 24, 36, 48, 60 und 72

Ergebnisse

Stunden untersucht. Der Virusüberstand wurde mit dem Fokustest (3.7) titriert, und die Titer der drei Viren miteinander verglichen (Abbildung 4.9). NB # 105 wächst deutlich schneller, und es können schon sechs Stunden nach der Infektion Viren nachgewiesen werden. NB # 105 wächst zu einer Log Stufe höherer Titer heran als PR8 NYMC oder PR8 RKI. Letzteres wächst schneller, zeigt aber vergleichbare Titer zu PR8 NYMC. Nach 72 Stunden erreicht PR8 RKI dann den Titer von NB # 105 also eine Log Stufe höher als PR8 NYMC.

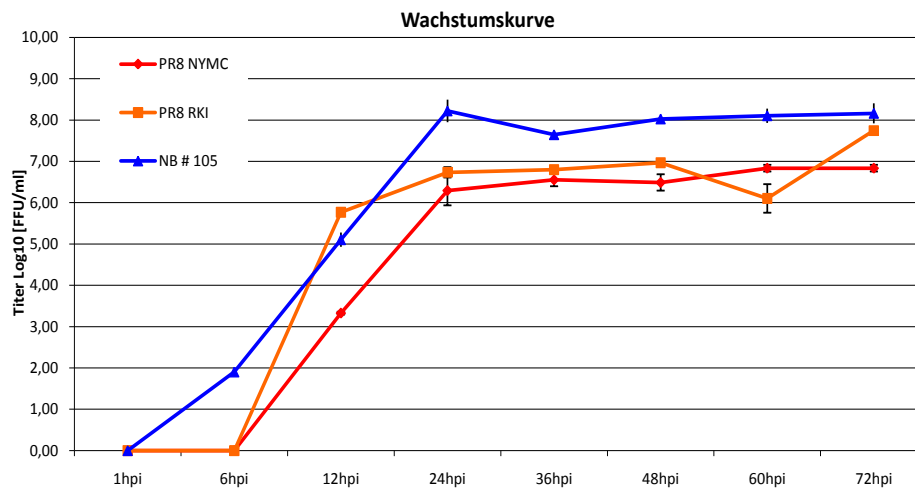


Abbildung 4.9 Wachstumskurve von NB # 105 im Vergleich zu beiden PR8 Viren

MDCK33016 PF Zellen wurden mit einer $MOI\ 10^{-3}$ infiziert. Zu angegebenen Zeitpunkten der Infektion wurden Proben genommen und der Titer mit dem Fokus Test bestimmt (FFU: Focus Forming Units).

NB # 105 zeigt das beste Wachstum der drei Viren. Durch seine Adaption an die MDCK33016 PF Zelle ist dieses Virus optimal an das Wachstum in diesem System angepasst.

4.2.6 Wachstumsuntersuchungen der Viren PR8 NYMC, PR8 RKI und NB #105 unter Anwesenheit des ERK Inhibitors U0126

Die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade gehört zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskaden. Diese Kaskaden sind notwendig um extrazelluläre Signale in zelluläre Reaktionen umzusetzen. Ras (Rat sarcoma) und Protein Kinase C (PKC) werden durch Zytokine, Wachstumsfaktoren oder virale Infektionen aktiviert und phosphorylieren ihrerseits Raf (rapidly growing fibrosarcoma) welches wiederum MEK 1/2 (MAP/ERK Kinase) phosphoryliert. ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase) wird von den phosphorylierten MEK aktiviert und gelangt in den Zellkern, wo es als

Ergebnisse

Transkriptionsfaktor wirkt und die Proliferation sowie die Zelldifferenzierung reguliert. Die ERK Aktivierung während der produktiven Influenzavirus Infektion führt zur virusinduzierten Cytokinproduktion und zu Atemwegsentzündungen (Mizumura *et al.*, 2003), zur selben Zeit scheint die virale Replikation durch die ERK-Aktivierung unterstützt zu werden (Pleschka *et al.*, 2001).

Beim Wachstum von NB # 105 auf der MDCK33016 PF Zelle scheint die Phosphorylierung von ERK herunter reguliert zu sein. Eventuell ergibt sich für dieses Virus ein Wachstumsvorteil, wenn der ERK Weg nicht im vollen Maße aktiv ist. Daher wurde ein Wachstumsvergleich in der MDCK33016 PF Zelllinie mit PR8 NYMC, PR8 RKI und NB # 105 unter Zugabe des MEK Inhibitors U0126 durchgeführt. U0126 inhibiert die Phosphorylierung von ERK nicht-kompetitiv. Somit ist der ERK Weg selektiv inhibiert. NB # 105 sollte auch bei Inhibition des MAP Kinase Wegs effektives oder sogar verbessertes Wachstum zeigen, da es selbst den Weg schon herunter reguliert. PR8 NYMC und PR8 RKI sollten hingegen schlechteres Wachstum zeigen.

Zum Nachweis, dass U0126 die Phosphorylierung von ERK effizient unterdrückt, wurde ein Western Blot durchgeführt, in dem sowohl ERK als auch phosphoryliertes ERK nachgewiesen wurden. U0126 unterdrückt die Phosphorylierung von ERK bei einer Konzentration von 10 μ M effizient (Abbildung 4.10).

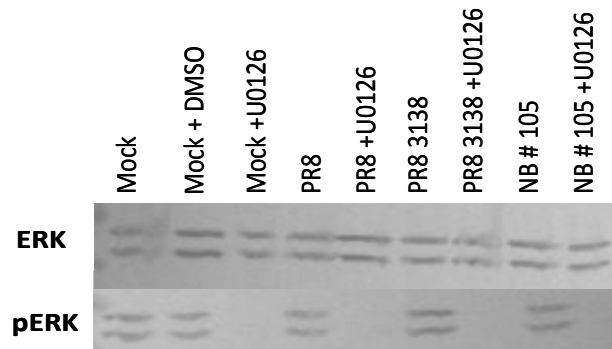


Abbildung 4.10 Phosphorylierungsmuster von ERK in MDCK33016 PF Zellen während der Infektion mit Influenza A Viren

Die MDCK33016 PF Zellen wurden entweder mit (10 μ M) oder ohne U0126 mit einer MOI 1 infiziert. Nach verschiedenen Zeitpunkten wurden die Zellen im Westernblot auf die Phosphorylierung von ERK hin untersucht. ERK wurde als Kontrolle zusätzlich gefärbt. Beispielfhaft ist hier der acht Stunden Wert einer Infektion gezeigt.

Zur Untersuchung von PR8 NYMC, PR8 RKI und NB # 105 wurden Infektionen mit 10 μ M U0126 und ohne U0126 mit einer MOI 1 durchgeführt. Nach 24 Stunden wurden die Viren mit dem Fokus-Test titriert. PR8 NYMC zeigt 2,5 – 3,5 Log Stufen niedrigere

Ergebnisse

Titer als PR8 RKI und NB # 105 (Abbildung 4.11). Der Inhibitor U0126 führte in 10 μ M Konzentration nicht zu einer Abnahme der Titer, obwohl eine Aktivierung von ERK nicht mehr nachweisbar ist.

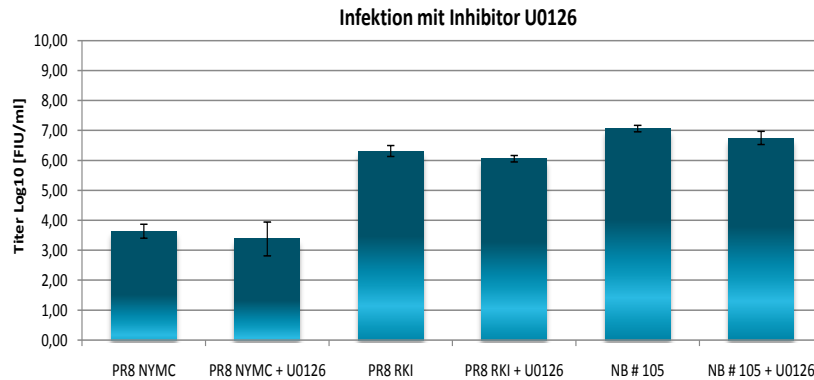


Abbildung 4.11 Infektiöse Titer mit und ohne Inhibitor U0126 (10 μ M).

Die Viren wurden mit einer MOI 1 infiziert, 30 min vor und sechs Stunden nach der Infektion wurden 10 μ M U0126 oder PFM hinzugegeben. Die Versuche wurden im Vierfachansatz durchgeführt. Nach 24 Stunden wurden die Viren mit dem Fokus-Test titriert (FFU: Focus Forming Units).

Zur weiteren Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Viren mit dem ERK Inhibitor U0126 wurde eine Wachstumskurve mit PR8 NYMC und NB # 105 (MOI 0,1) durchgeführt. Es wurden zu vier Zeitpunkten (1, 8, 12 und 24 hpi) Proben genommen und diese anschließend mit dem Fokus Test titriert (Abbildung 4.12). Das Virus PR8 NYMC hatte niedrige Titer, die nach Zugabe des Inhibitors (40 μ M) nur noch nach 24 Stunden zu detektieren waren. Die Titer von PR8 NYMC ohne Inhibitor ähneln denen von NB # 105 mit der höchsten Konzentration des Inhibitors. Beide Viren zeigen nur bei 40 μ M U0126 eine Abnahme des Titer um mehr als eine Log Stufe, bei 5 μ M Inhibitorkonzentration konnte weder bei NB # 105 noch bei PR8 NYMC eine Veränderung des Wachstums gesehen werden. NB # 105 zeigt in Anwesenheit des Inhibitors kein verbessertes Wachstum. Mit 40 μ M Inhibitor wurde ebenfalls eine Abnahme des Titer um 1 Log Stufe beobachtet. Es konnte kein verbessertes Wachstum des NB # 105 Virus in Anwesenheit von U0126 nachgewiesen werden.

Ergebnisse

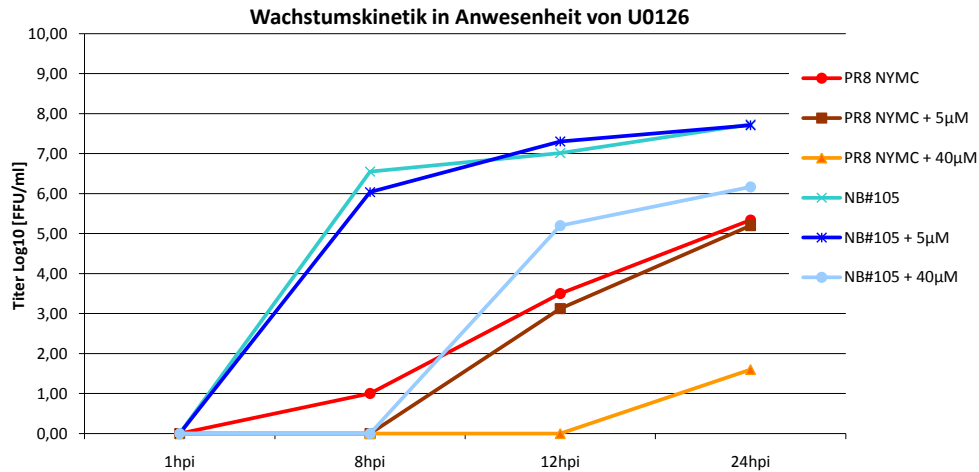


Abbildung 4.12 Wachstumskurve von NB # 105 und PR8 NYMC mit verschiedenen Konzentrationen des Inhibitors.

Die MDCK33016 PF Zelle wurde mit einer MOI 0,1 mit NB # 105 und PR8 NYMC infiziert, und es wurden angegebene Konzentrationen von U0126 sowohl 30 min vor wie auch 8 Stunden nach der Infektion zu dem Medium gegeben. Nach 1, 8, 12 und 24 Stunden wurde eine Probe genommen. Der Überstand wurde mit dem Fokus-Test titriert. (FFU: Focus Forming Units).

4.2.7 Wachstum der Viren PR8 NYMC, PR8 RKI und NB # 105 im Plaquetest

Mit einem Plaquetest sollte untersucht werden, wie schnell Viren auf der MDCK33016 PF Zelle wachsen, wobei sie einen CPE hervorrufen. Daher wurde mit PR8 NYMC, PR8 RKI und NB # 105 das Wachstum in einem Plaquetest untersucht. NB # 105 generiert sehr homogene große Plaques (Abbildung 4.13). Dies ist ein Zeichen für eine produktive Virusvermehrung und effiziente Infektion weiterer Zellen.

Bei PR8 NYMC hingegen sind die Löcher im Zellrasen inhomogen. Es gibt viele kleine und wenige große Plaques. Dies lässt auf eine durchmischte Viruspopulation schließen, in der sowohl gut wie auch schlecht an das Wirtssystem angepasste Viren vorhanden sind. PR8 RKI zeigt vermehrt Plaques, die vergleichbar mit NB # 105 sind. Allerdings sind hier auch vereinzelt kleine Plaques zu finden (Abbildung 4.13).

Ergebnisse

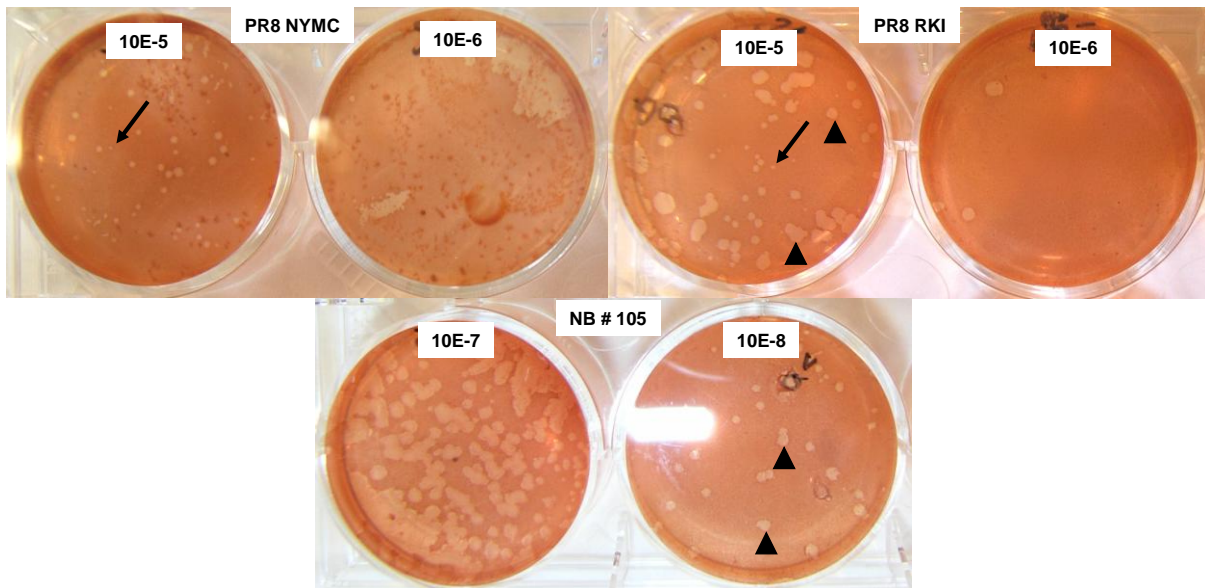


Abbildung 4.13 Plaquetest der verschiedenen Viren.

Adhärent gewachsene MDCK33016 PF Zellen wurden mit den aufgeführten Viren in einer Verdünnungsreihe infiziert. Nach Adsorption der Viren wurden die Zellen mit Agarose überschichtet und sechs Tage später mit Neutralrot angefärbt. Helle Stellen bedeuten von Virus zerstörte Zellen. → kleinen Plaques, ▲ große Plaques. PR8 NYMC produziert insgesamt kleinere Plaques als NB # 105 und PR8 RKI. NB # 105 zeigt sehr homogene große Plaques. PR8 RKI zeigt vermehrt große Plaques im Vergleich zu PR8 NYMC.

4.2.8 Wachstumsvergleich von PR8 NYMC und PR8 RKI mit NB # 105 in Hühnereiern

Bei der Infektion von Hühnereiern wurde untersucht, ob PR8 NYMC und PR8 RKI, welche durch jahrelanges Passagieren auf Eier für das Wachstum in Eiern etabliert wurden, einen Vorteil gegenüber dem nur auf der Zelle gewachsenen Virus NB # 105 zeigen. Hierzu wurden die Viren mit zwei verschiedenen MOI getestet und jeweils pro MOI 10 Eier infiziert. Die drei getesteten Viren wachsen zu hohen Titern auf Eiern. Allerdings zeigte sich, dass PR8 NYMC erst in der höheren Verdünnung die Eier effizient infizieren kann, PR8 RKI zeigt einen leichten Anstieg des Titers bei der höheren Verdünnung. Bei NB # 105 ist kein Unterschied zwischen den einzelnen Verdünnungsstufen zu erkennen. Beide PR8 Viren wachsen auch auf Eiern zu niedrigeren Titern heran als NB # 105.

PR8 NYMC zeigt vergleichbare Titer mit PR8 RKI, jedoch erst bei der höheren Verdünnung. NB # 105 wächst zu etwa einer Log Stufe höheren Titern als beide PR8 Viren. Eventuell sind sehr viele defekte Partikel in der PR8 NYMC Virussuspension. Bei höheren Verdünnungen werden auch die defekten Partikel verdünnt, und im Ei kann dann besseres Wachstum stattfinden.

Ergebnisse

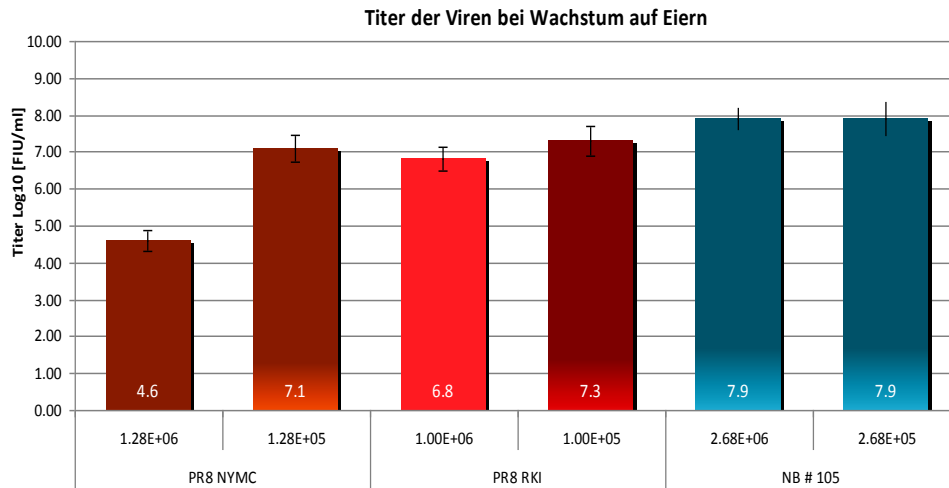


Abbildung 4.14 Titer der Viren beim Wachstum auf Eiern.

Die Eier wurden mit verschiedenen Mengen Virus (1×10^6 FIU/200 μ l oder 1×10^5 FIU/200 μ l) infiziert. Die Verdünnungen wurden in PBS hergestellt und 200 μ l direkt in elf Tage alte embryonierte Hühnereier gegeben. Nach 72 Stunden wurde die Allantoisflüssigkeit entnommen und der Titer mit dem Fokus Test bestimmt. (FFU: Fokus Forming Units)

4.2.9 Untersuchung der Polymeraseaktivität mit den Plasmiden von PR8 NYMC und NB # 105

Für die Generierung eines optimalen Donorstammes zur Saatvirusherstellung müssen alle Gene dieses Virus bestmöglich aufeinander abgestimmt sein. Nur so kann eine effiziente Replikation gewährleistet werden. Zur Untersuchung der Aktivität der viralen Polymerasegene des PR8 NYMC und NB # 105 wurde ein Luziferase Test durchgeführt (3.12). So kann untersucht werden, ob verschiedene Kombinationen zwischen PR8 NYMC und NB # 105 Polymerasegenen erhöhte Polymeraseaktivität zeigen. Die Polymeraseaktivität verschiedener Viren ist abhängig vom jeweiligen Wirtssystem. In unterschiedlichen Zelltypen zeigen verschiedene Polymerasen veränderte Aktivitäten. In unterschiedlichen Wirten etablieren die Polymerasegene Mutationen, die ihr Wirtsspektrum beeinflussen können (Gabriel *et al.*, 2007).

MDCK33016 PF Zellen wurden mit den Plasmiden für PB1, PB2, PA und NP, dem Luciferase- und dem Renilla-Plasmid transfiziert und nach 24 Stunden die Polymeraseaktivität gemessen. Die viralen Plasmide wurden in gleichen Konzentrationen eingesetzt. Das Renilla-Plasmid wurde als interner Standard mitgeführt. Bei der Auswertung wurde das Plasmidset von PR8 NYMC als 100 % Wert angenommen und die anderen Sets dazu ins Verhältnis gesetzt. NB # 105 zeigte eine deutlich niedrigere Polymeraseaktivität als PR8 NYMC. Die Polymeraseaktivität des

Ergebnisse

PR8 NYMC konnte durch den Austausch des PA oder NP mit denen des NB # 105 deutlich gesteigert werden. Wenn beide NB # 105 Plasmide (PA und NP) zusammen transfiziert wurden, war der Vorteil zu reinem PR8 NYMC nicht mehr vorhanden. PB1 oder PB2 von NB # 105 im PR8 NYMC Hintergrund zeigten eine über die Hälfte verringerte Aktivität verglichen mit PR8 NYMC. Das PB2-NB # 105 im PR8 NYMC Hintergrund ist vergleichbar mit dem NB # 105 Originalset während PB1 im PR8 NYMC Hintergrund eine leichte Verbesserung zu dem NB # 105 Set, aber eine verminderte Aktivität zu dem PR8 NYMC Set, zeigte.

In einem NB # 105 Hintergrund zeigt nur der Austausch von NP (PR8 NYMC) eine verbesserten Aktivität im Vergleich zum reinen NB # 105. Die Aktivität des reinen NB # 105 war deutlich niedriger als erwartet. Da das Virus auf der MDCK33016 PF Zelle ein deutlich besseres Wachstum als PR8 NYMC zeigte, wurde eine erhöhte Polymeraseaktivität verglichen zur PR8 NYMC Polymerase erwartet. Die Aktivität der NB # 105 Polymerase konnte nicht über die Aktivität der PR8 NYMC Polymerase gesteigert werden. NB # 105 mit NP (PR8 NYMC) konnte eine Verdopplung der Polymeraseaktivität im Vergleich zum NB # 105 Polymerasekomplex hervorrufen. Die beiden Gene PA und NP von NB # 105 hingegen konnten die Aktivität des PR8 NYMC deutlich steigern. Dies galt allerdings nur im singulären Austausch.

Das Wachstumsverhalten zwischen PR8 NYMC und NB # 105 kann mit den Polymeraseaktivitäten nicht erklärt werden. Eventuell spielen andere Gene bei dem deutlich besseren Wachstum von NB # 105 im Vergleich zu PR8 NYMC eine wichtige Rolle.

Ergebnisse

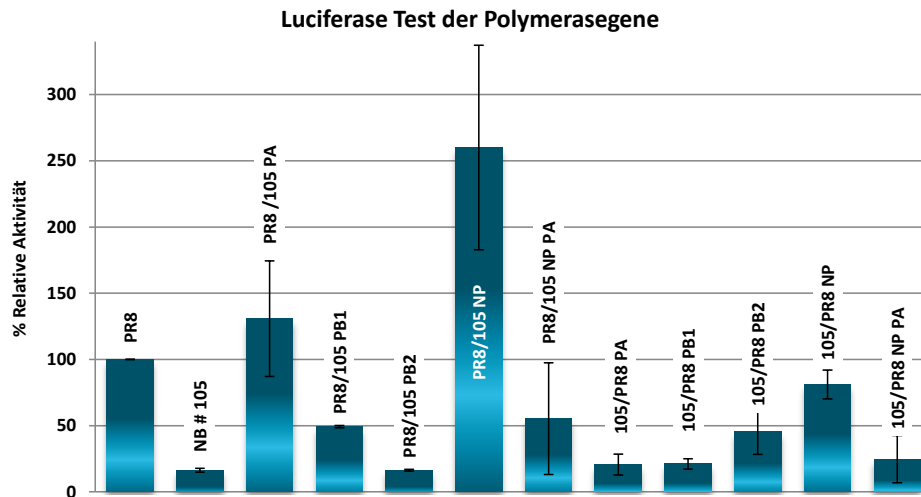


Abbildung 4.15 Luciferase Test der Polymerasen von PR8 NYMC und NB # 105.

Die Polymeraseaktivität wurde in einem Luciferasetest untersucht. Die verschiedenen Plasmide der Viren wurden in MDCK33016 PF Zellen transfiziert und die Aktivität durch ein Luciferaseplasmid gemessen. Die verschiedenen Kombinationen wurden im Vierfachansatz ausgetestet und der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet. Der Polymerasekomplex von PR8 NYMC wurde dabei immer als 100 % angesehen.

4.2.10 Wachstumskurven der rekombinanten Viren

Das Wachstumsverhalten eines idealen Donorstammes muss unabhängig von dem jeweiligen HA und NA sein. Daher wurden mittels des Reversen Genetik (RG) Verfahrens diverse Viren hergestellt, die bei gleichen internen Genen verschiedene HA und NA Gene besitzen. Zum Vergleich der beiden Donorviren (PR8 NYMC und NB # 105) wurden beide mit den gleichen HA und NA Genen hergestellt und in Wachstumsversuchen direkt miteinander verglichen. Es wurden sowohl saisonale und pandemische H1N1 als auch H3N2 Reassortanten hergestellt. Des Weiteren wurde ein PR8 Virus hergestellt, welches PA, NP oder PA in Kombination mit NP von NB # 105 besitzt, um herauszufinden, ob eine gesteigerte Polymeraseaktivität ein verbessertes Wachstum dieser Viren hervorruft. Eine Übersicht der getesteten Viren ist in Tabelle 4.4 zu sehen.

Ergebnisse

Tabelle 4.4 Schematische Darstellung der getesteten Viren

Virusname	Virussegmente							
	PB2	PB1	PA	HA	NP	NA	M	NS
RG PR8								
RG PR8 + 105p30 HA/NA								
RG PR8 + A/California/07/09 HA/NA								
RG PR8 + A/Uruguay/716/07 HA/NA								
RG PR8 + 105p30 PA								
RG PR8 + 105p30 NP								
RG PR8 + 105p30 PA/NP								
RG 105p30								
RG 105p30 + PR8 HA/NA								
RG 105p30 + A/California/07/09 HA/NA								
RG 105p30 + A/Uruguay/716/07 HA/NA								
X179A SSV0906								
X175CSSV0811								

Viren mit den jeweiligen Gensegmenten wurden mittels der Reversen Genetik hergestellt.

Die Gensegmente von den angegebenen Viren wurden verwendet. Braun: PR8 NYMC, Blau: NB # 105, Gelb: A/California/07/09 (H1N1) und Grün: A/Uruguay/716/07 (H3N2). X179A und X175C sind klassisch hergestellte Saatviren mit den angegebenen Genen.

Die gezeigten Viren wurden in Wachstumskurven miteinander verglichen. Die MDCK33016 PF Zellen wurden mit einer MOI von 10^{-3} infiziert und 1, 6, 12, 24, 36, 60 und 72 Stunden nach der Infektion Proben genommen (Abbildung 4.16, Abbildung 4.17, Abbildung 4.19). Für die Untersuchung des Wachstums von NB # 105 wurde zuerst der Austausch des HA und NA mit dem des bisherigen Donorstammes PR8 NYMC untersucht. RG PR8 wächst auf der MDCK33016 PF besser als RG 105p30 (die Plasmide wurden mit den Genen des NB # 105 der Passage 30 hergestellt). Der Titer des RG PR8 + 105p30 HA/NA ist um eine Log Stufe niedriger, so dass hier die Titer mit denen von RG 105p30 übereinstimmen. Eine besseres Wachstum von RG 105p30 + PR8 HA/NA konnte hingegen nicht erzielt werden. Dieses Virus wächst sogar über eine Log Stufe schlechter als das RG 105p30 (Abbildung 4.16).

Ergebnisse

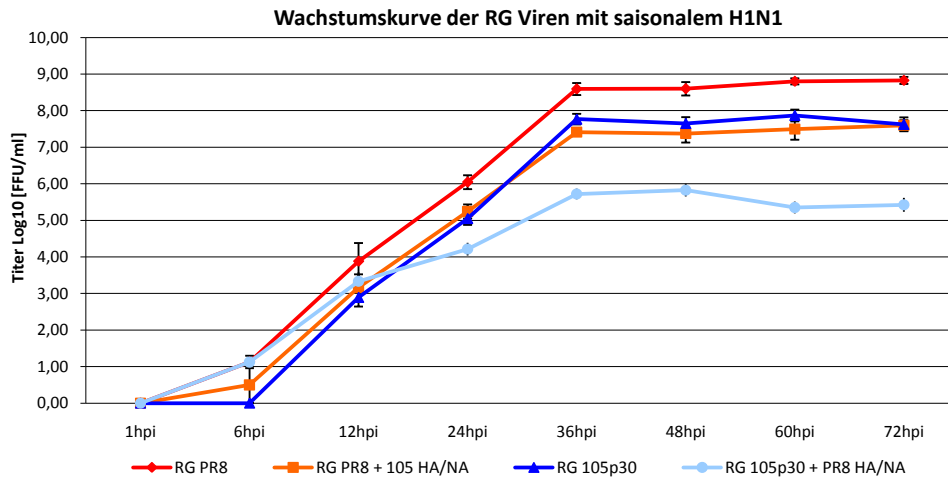


Abbildung 4.16 Wachstumskurve der rekombinanten H1N1 Viren

Die MDCK33016 PF Zellen wurden mit den Viren RG PR8, RG PR8 + 105 HA/NA, RG 105p30 und RG 105p30 + PR8 HA/NA mit einer MOI von 10^{-3} infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen, die anschließend mit dem Fokus-Test titriert wurden. Die Infektion wurde im Vierfachansatz durchgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichung der Titer wurden berechnet (FFU: Focus Forming Units).

Zur weiteren Untersuchung des Wachstums von NB # 105 mit unterschiedlichen HA und NA Genen wurden Reassortanten von NB# 105 und PR8 NYMC hergestellt, welche das HA und NA von A/California/07/09 besitzen. Zusätzlich wurde das Saatvirus für die pandemische Impfstoffproduktion (X179A SSV0906) untersucht, welches außer dem NA und HA das PB1 des A/California/07/09 besitzt. Dieses Virus wächst zu Beginn der Infektion sehr schnell, zeigt nach 12 hpi aber nur noch einen sehr geringen Anstieg der Titer (Abbildung 4.17). RG 105p30 + A/California/07/09 HA/NA und RG PR8 + A/California/07/09 HA/NA zeigen 1 bzw. 3 Log Stufen schlechteres Wachstum respektive im Vergleich mit X179A SSV0906. RG 105p30 + A/California/07/09 HA/NA wächst zu etwa 2 Log Stufen höheren Titern als RG PR8 + A/California/07/09 HA/NA (Abbildung 4.17). RG PR8 + A/California/07/09 HA/NA, RG 105p30 + A/California/07/09 HA/NA und X179A SSV0906 zeigten niedrigere Titer und langsames Wachstum verglichen mit RG PR8 und NB # 105.

Ergebnisse

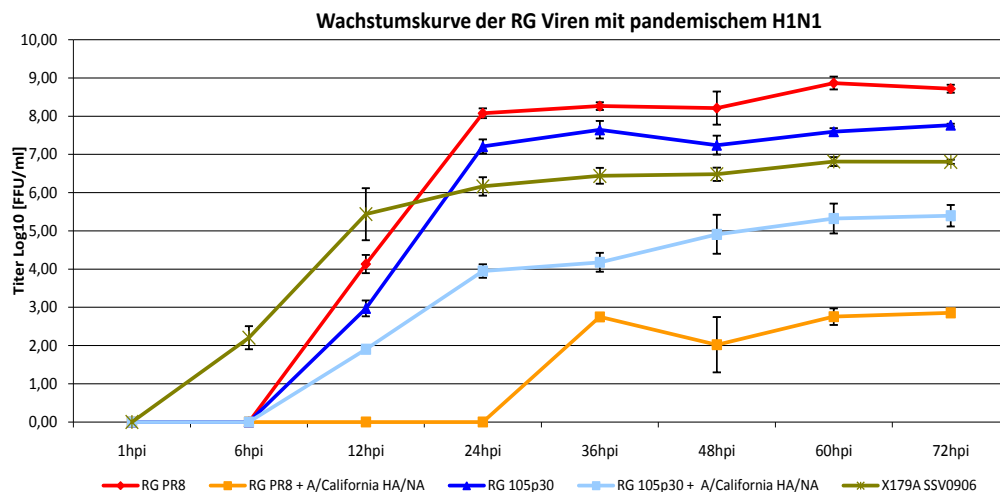


Abbildung 4.17 Wachstumskurve der rekombinanten Viren mit pandemischem H1N1

Die MDCK33016 PF Zellen wurden mit einer MOI von 10^{-3} infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen, die anschließend mit dem Fokus-Test titriert wurden. Die Infektion wurde im Dreifachansatz durchgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichung der Titer wurden berechnet (FFU: Focus Forming Units). (X179A SSV0906 ist eine klassische A/California/07/09 und PR8 Reassortante mit zusätzlichem PB1 von A/California/07/09).

Zusätzlich zu der Wachstumskurve wurde eine Infektionskinetik, durch Färbung der Zellen mit einem Influenza-A-Antikörper gegen M und NP (Oxoid) hergestellt (Abbildung 4.18). Schon 24 Stunden nach der Infektion haben die Viren, bis auf RG 105p30 + A/California/07/09 und RG PR8 + A/California/07/09, über 90% der Zellen infiziert. RG 105p30 + A/California/07/09 erreicht eine über 90%ige Infektion erst 48 hpi, während RG PR8 + A/California/07/09 selbst nach 72 Stunden nur knapp 10% der Zellen infiziert hat.

Ergebnisse

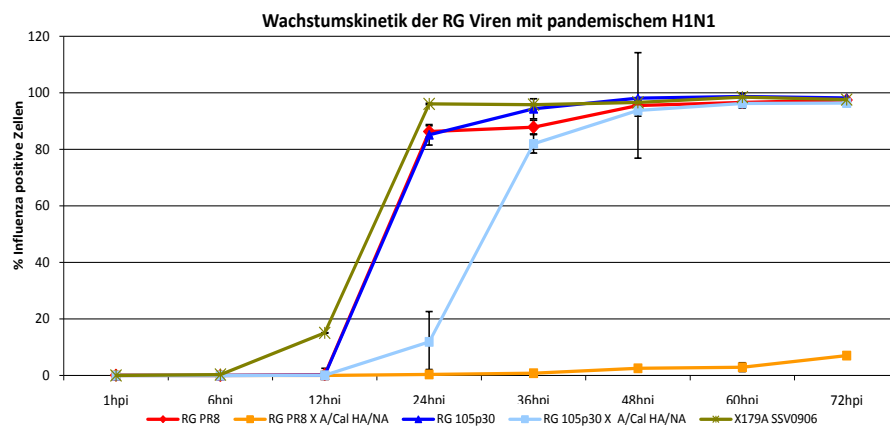


Abbildung 4.18 Wachstumskinetik der rekombinanten Viren mit pandemischem H1N1

Die MDCK33016 PF Zellen wurden mit einer MOI von 10^{-3} infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten Zellen entnommen, die anschließend mit Influenza-A-Antikörper gefärbt und mit dem Durchflusszytometer gemessen wurden. Die Infektion wurde im Dreifachansatz durchgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichung der Werte wurden berechnet. (X179A SSV0906 ist eine klassische A/California/07/09 Reassortante mit PR8 Donor und zusätzlichem PB1 von A/California/07/09).

H3N2 Reassortanten wurden ebenso auf das Wachstum getestet. Es wurden Reassortanten untersucht, welche mit den Oberflächenproteinen von A/Uruguay/716/07 (H3N2) generiert wurden. Zusätzlich wurde die konventionelle Reassortante (X175C SSV0811), welche für die Impfstoffproduktion verwendet wird, untersucht. RG PR8, RG 105p30 mit den Uruguay/716/07 HA/NA Genen und die klassische Reassortante X175C zeigen fast identische Wachstumskurven, während RG 105p30 ein verzögertes Wachstum zeigt, nach 48 Stunden aber zu gleichen Titern heranwächst. RG PR8 + Uruguay/716/07 HA/NA wächst schlecht und hat auch nach 48 Stunden noch einen um drei Log Stufen niedrigeren Titer als die anderen getesteten Viren (Abbildung 4.19).

Ergebnisse

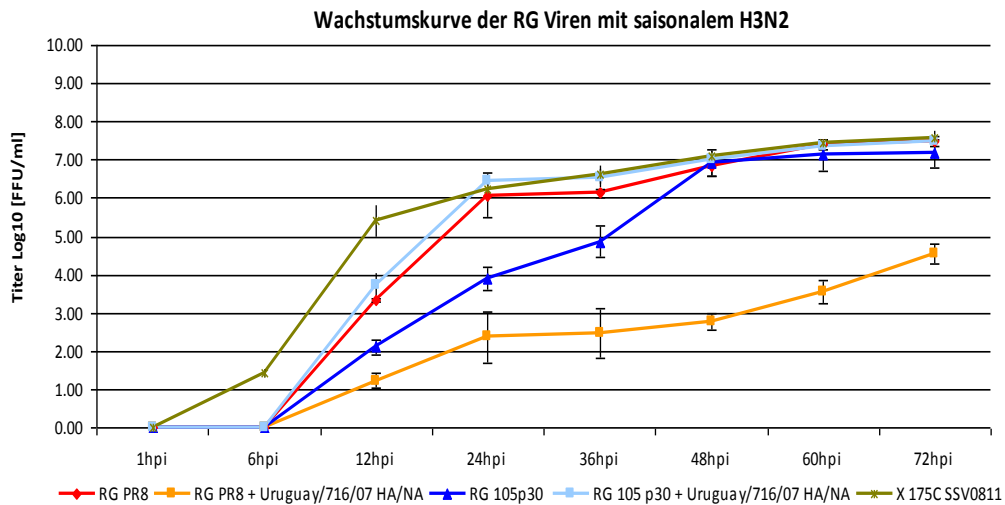


Abbildung 4.19 Wachstumskurve der rekombinanten H3N2 Viren

Die MDCK33016 PF Zellen wurden mit einer MOI von 10^{-3} infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen, die anschließend mit dem Fokus-Test titriert wurden. Die Infektion wurde im Dreifachansatz durchgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichung der Titer wurden berechnet (FFU: Focus Forming Units). (X175A SSV0811: klassische Reassortante von A/Uruguay/716/07 (H3N2) und PR8 NYMC).

Die Ergebnisse des Polymerasetests werfen die Frage auf, ob PR8 Viren mit PA oder NP von NB # 105 durch die erhöhte Polymeraseaktivität besser auf den MDCK33016 PF Zellen wachsen, als RG PR8. Daher wurden Viren mit den verschiedenen Genkombinationen hergestellt (RG PR8 + 105p30 NP; RG PR8 + 105p30 PA und RG PR8 + 105p30 PA/NP). Die Viren mit Austausch in PA oder NP zeigen eine Log Stufe niedrigere Titer als RG PR8 und RG 105p30 (Abbildung 4.20). Es macht keinen Unterschied, ob nur ein Gen oder PA und NP zusammen ausgetauscht wurde, auch wenn die Polymeraseaktivität deutlich unterschiedlich ist (4.2.9). Die Titer der PR8 Viren mit den Austauschen in den Polymerasegenen ähneln denen der Viren RG 105p30 + PR8 HA/NA und RG 105p30 + A/California/07/09 HA/NA, welche zwei Log Stufen schlechter wachsen als RG 105p30.

Ergebnisse

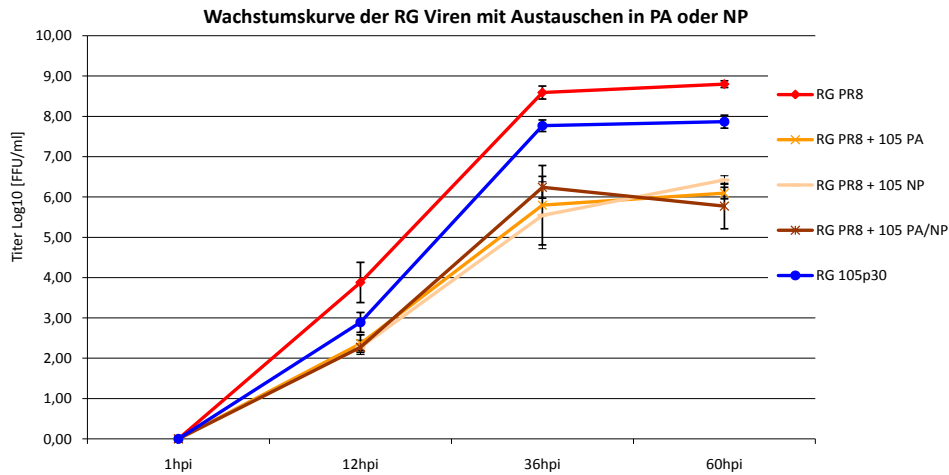


Abbildung 4.20 Wachstumskurve der rekombinanten Viren mit Austauschen in PA, NP oder PA/NP

Es wurden RG Viren hergestellt, welche Austausche in den Genen PA oder NP besitzen, die für eine höhere Polymeraseaktivität im PR8 Hintergrund sorgen und diese in einer Wachstumskurve mit RG PR8 und RG 105p30 verglichen. Die MDCK33016 PF Zellen wurden mit einer MOI von 10^{-3} infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen, die anschließend mit dem Fokus-Test titriert wurden. Die Infektion wurde unabhängig im Vierfachansatz durchgeführt. Die Mittelwerte und Standardabweichung der Titer wurden berechnet. (FFU: Focus Forming Units)

Zusätzlich zu der Wachstumskurve wurde in diesem Experiment die Viruspartikelanzahl mit RTD-PCR (3.11) bestimmt. Es können schon nach einer Stunde Viruspartikel in den Polymerasereassortanten nachgewiesen werden (Abbildung 4.21). Um die Viruspartikel zu einem so frühen Zeitpunkt nachweisen zu können, müssen im Ausgangsmaterial dieser Reassortanten schon mehr Viruspartikel vorhanden gewesen sein, als die infektiösen Titer vermuten lassen. Dies könnte daran liegen, dass diesen Reassortanten mehr defekte Viruspartikel bilden, welche nicht infektiös sind. Nach 12 Stunden sind die Partikelzahlen der untersuchten Viren auf gleichem Niveau. Bis zum Ende der Infektion erreichen die Polymerasereassortanten keine höhere Virenzahl mehr als die RG PR8 und NB # 105. Eine erhöhte Virusanzahl zu Beginn der Infektion könnte bei RG PR8 + 105p30 NP; RG PR8 + 105p30 PA und RG PR8 + 105p30 PA/NP zu einem verringerten Wachstum geführt haben. Die defekten Partikel können an die zellulären Rezeptoren binden, aber nicht in die Zelle eindringen oder dort nicht effizient replizieren.

Ergebnisse

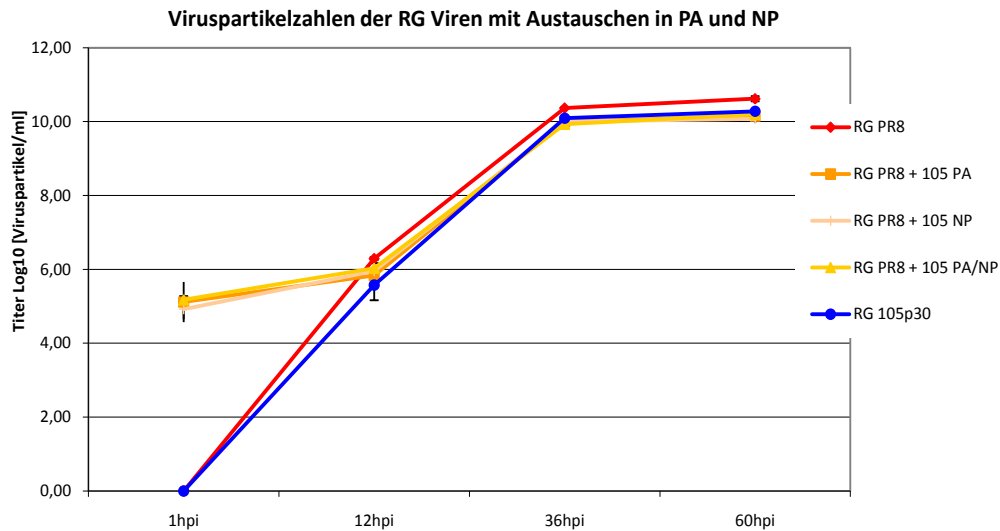


Abbildung 4.21 RTD-PCR der rekombinanten Viren mit Austauschen in PA, NP oder PA/NP

Es wurden RG Viren hergestellt, welche die Polymeraseaustausche besitzen, die für eine höhere Polymeraseaktivität im PR8 Hintergrund sorgen und diese in einer Wachstumskurve mit den RG PR8 und RG 105p30 verglichen. Die MDCK33016 PF Zellen wurden mit einer MOI von 10^{-3} infiziert und zu den angegebenen Zeitpunkten Proben entnommen. Die Viruspartikel wurden mittels RTD-PCR nachgewiesen, es werden sowohl infektiöse als auch nichtinfektiöse Partikel detektiert.

Die Untersuchungen des neuen Donorstammes NB # 105 haben gezeigt, dass dieses Virus für die Generierung von Saatviren auf der Zellkultur grundsätzlich geeignet ist. NB # 105 wächst auf der MDCK33016 PF Zelle deutlich besser als das Vergleichsvirus PR8 NYMC. Die Titer der RG 105 Viren mit verändertem HA/NA zeigten ähnliche oder sogar höhere Titer verglichen mit den RG PR8 Viren sowohl mit H1N1 als auch mit H3N2.

5 Diskussion

5.1 Vergleiche zwischen Ei- und Zellviren

Die Antigenität der Influenzaviren sollte beim Prozess der Impfstoffherstellung so wenig wie möglich verändert werden. Während der Passagierung der Viren in unterschiedlichen Wirtssystemen (z.B. Ei und Zelle) können Mutationen auftreten, welche Wachstumsunterschiede oder eine veränderte Antigenität bewirken können. Humane Influenzaviren werden für die Impfstoffproduktion auf Eiern isoliert und anschließend überwiegend in Eiern passagiert. Bei vielen klinischen Proben, welche sowohl in der Zellkultur als auch im Ei isoliert wurden, konnten im Vergleich zu zellgewachsenen Viren deutliche mehr antigenetische Variationen in den Eiviren gefunden werden. Eine Mutation im HA (H3) an Position 186 führte zu einer Veränderung der Antigenität (Meyer *et al.*, 1993). Des Weiteren ist das HA von Viren, welche auf MDCK Zellen isoliert wurden, sowohl antigenetisch und strukturell identisch zu den Ausgangsviren, während Viren aus Eiern aufgrund von Aminosäureaustauschen in verschiedene antigenetische Subpopulationen eingeteilt werden konnten (Katz & Webster, 1988). Diese Ergebnisse zeigen, wie wichtig es ist, die Viren auf Wirtssystemen, die dem natürlichen Wirt (humanen Epithelzellen) möglichst nahe kommen, zu isolieren. Daher wurden Vergleiche zwischen der Hundezelllinie MDCK33016 PF, die aufgrund ihrer Herkunft eine Epithelzelle ist, und Eiern durchgeführt. Wie erwartet, traten bei den meisten der eigewachsenen Viren spezifische „Eimutationen“ auf, wohingegen bei den zellbasierten Viren keinerlei Mutationen während fünf Passagen gefunden wurden. Eine Mutation an Position G186V (bei NB # 260 G186D) oder H183L (NB # 009) führt zu einer verbesserten Rezeptorbindung in Eiern (Gambaryan *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2005; Widjaja *et al.*, 2006). Es kann zu verschiedenen weiteren Anpassungen kommen, die die Bindung an α 2-3 Sialinsäuren verbessern (H1 AS 190 und 225; H3 AS 186. Austausch an AS 163 (H1) oder AS 187 (B) führen zum Verlust einer Glykosylierungsstelle wodurch es zu sterischen Interferenzen mit weiter entfernten Teilen des Rezeptors kommen kann. Alle Viren behielten während der gesamten Passagierung ihre Glykosylierungsstellen bei.

Diskussion

Des Weiteren können verbesserte ionische Wechselwirkungen mit negativ geladenen Molekülen durch Austausch von ungeladenen zu geladenen AS an der Spitze des HA zum verbesserten Wachstum im Ei führen (H1 AS 187, 189 und 190; H3 AS 145 und 156) (Gambaryan *et al.*, 1999). Eine Mutation, welche bei NB # 080 gefunden wurde, zeigt allerdings das Gegenteil, da hier an AS Position 187 eine Mutation von einer geladenen AS (D) zu einer ungeladenen AS (G) auftritt. Eventuell ist der Verlust der Wechselwirkung an dieser Position von Vorteil für das Wachstum dieses Virus im Ei.

Kürzlich wurde gezeigt, dass einzelne AS-Austausche im HA dazu führen, dass sich Viren effizienter in Eiern und auf MDCK Zellen vermehren (Chen *et al.*, 2010). Durch einzelne AS-Austausche konnten bis zu 10fach höhere Virustiter erreicht werden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass die Austausche an bestimmten Aminosäurepositionen (122 und 189) die Antigenität des Virus nicht veränderten. In den untersuchten Viren traten an diesen Stellen keine Mutationen auf.

Die AS Austausche L194P (NB # 084 und NB # 377) und D190G (NB # 260) liegen, wie die übrigen Austausche, in der Rezeptorbindungstasche und könnten für eine Anpassung an die α 2-3 Sialinsäuren sprechen. Beide Positionen sind in aviären Viren hochkonserviert, variieren aber in humanen Viren (Matrosovich *et al.*, 1997). Ein Austausch L194I führte zu besserem Wachstum des H1N1 Virus A/California/07/09 auf MDCK Zellen und in Eiern (Chen *et al.*, 2010). Der Austausch L194P könnte ebenso das Wachstum der Viren NB # 084 und NB # 377 in Eiern verbessert haben.

Die Rezeptorbindungstasche des HA für die Sialinsäuren wird unter anderem durch die AS 190, 194, 183, 186 gebildet. Die AS in dieser Tasche bilden Wasserstoffbrücken und Van-der-Waals-Bindungen und formen so die Rezeptorbindungstasche. Mutationen in diesen Bereichen führen zu Konformations- und Bindungsänderungen und können somit zu veränderter Sialinsäurepräferenz führen (Weis *et al.*, 1988). Alle gefundenen Mutationen stellen eine Anpassung an die Rezeptorbindung des jeweiligen Wirtssystems dar. Die humanen Isolate sind an den humanen Bronchialtrakt angepasst und binden somit bevorzugt α 2-6 gebundene Sialinsäuren. Die MDCK33016 PF Zelle hat auf ihrer Oberfläche sowohl α 2-6 als auch α 2-3 gebundene Sialinsäuren. Daher können humane Viren diese Zellen ohne einen Wechsel der Rezeptorspezifität infizieren. In embryonierten Hühnereiern herrschen α 2-3 gebundene Sialinsäuren vor, daher ist es für ein effizientes Viruswachstum in Eiern von Vorteil, wenn die Bindungsregion des HA verändert wird. Bei Influenza B Viren konnte gezeigt werden, dass ein Verlust der Glykosylierungsstelle an AS Position 196/197 zu deutlich besserem Wachstum im Ei

Diskussion

führt. Es kommt schon nach kurzer Passage in Eiern zu einer Mutation, welche diese Glykosylierungsstelle zerstört (Chen *et al.*, 2008). Das hier getestete Influenza B Virus zeigte schon im klinischen Isolat keine Glykosylierung an Position 196/197, daher konnte hier auch keine Mutation zu deren Verlust führen. In dem getesteten Influenza B Virus kam es zu keiner Mutation während der Passagierung.

Das Verhalten von den in unterschiedlichen Wirtssystemen gewachsenen Viren auf humanem bronchialem Gewebe ist ein guter Anhaltspunkt für Wachstumsveränderungen durch Mutationen oder Unterschiede in den Zuckerseitenketten. Es wurde gezeigt, dass auf in vitro gewachsenem humanem Zellgewebe (wie HBEC) zilierte Zellen α 2-3 Sialinsäuren und nicht zilierte Zellen α 2-6 Sialinsäuren als Hauptglykan besitzen (Matrosovich *et al.*, 2004). Die humanen Influenzaviren infizieren bevorzugt nicht zilierte Zellen, in denen sie optimal replizieren können. Viren mit einer aviären Rezeptorspezifität infizieren hauptsächlich die zilierten Zellen, in denen die Replikation nicht optimal stattfindet (Matrosovich *et al.*, 2004). Daher können auf humanen Bronchialzellen Viren mit beiden Sialinsäurepräferenzen, wenn auch mit unterschiedlicher Effizienz, wachsen. So bietet dieses System einen guten Einblick in das Wachstum der Viren im humanen System. Bis auf die Ausnahme NB # 260 (H3N2) zeigen alle zellgewachsenen Viren besseres Wachstum auf den HBEC. NB # 260 zeigte gleiche Titer, unabhängig davon ob es vorher auf Eiern oder in Zellen gewachsen war. Der Wachstumsvorteil der zellbasierten Viren kann zum Einen mit den Mutationen in der Rezeptorbindungsstelle, wie oben beschrieben, erklärt werden, zum Anderen auf eine veränderte Glykanstruktur der Proteine der Virenmembran in den verschiedenen Wirtssystemen schließen lassen (Romanova *et al.*, 2003; Schwarzer *et al.*, 2009), welches von Vor- oder Nachteil für das Wachstum in anderen Systemen ist.

Eine veränderte Menge von HA Proteinen auf der Virusoberfläche könnte die Bindung der Viren an bestimmte Glykanstrukturen verändern. Wenig HA auf der Virosoberfläche kann zum Beispiel dazu führen, dass die Viren keine Hühnererythrozyten mehr binden können (Kumari *et al.*, 2007). Bei einer höheren HA-Dichte auf einer Zelloberfläche können diese Erythrozyten gebunden werden, auch wenn das HA keine Mutationen zeigte. Diese verschiedenen Einflüsse auf das Bindungsverhalten und das Wachstum können dazu beigetragen haben, dass zellbasierte Viren (NB # 324 und NB # 215), auch ohne Mutationen im HA oder NA, besseres Wachstum auf HBEC zeigen.

Alle untersuchten H3N2 Viren besitzen zwischen 10 und 12 potentielle Glykosylierungsstellen, die durch die Mutationen nicht beeinflusst wurden. Kürzlich

Diskussion

isolierte H3N2 Viren besitzen zum Teil bis zu 12 N-Glykosylierungsstellen im HA (Zhirnov *et al.*, 2009). Die getesteten H1N1 und B Viren besitzen zehn Glykosylierungsstellen, welche auch im Verlauf der Passagierung erhalten blieben (A.1). Beim Wachstum der Viren in unterschiedlichen Wirtssystemen können durch die veränderten Glykosylierungsmuster Unterschiede in der HA-Bindung und der Neuraminidaseaktivität auftreten. Viren, die in Eiern gewachsen sind, zeigen höhere NA Aktivität als solche, die auf Zellen gewachsen sind (Alymova *et al.*, 1998; Aymard *et al.*, 1996). Dies spiegelte sich auch in den untersuchten Influenza A Viren wieder. Alle Influenza A Viren zeigten deutlich geringere NA-Aktivität, wenn sie auf Zellen wuchsen (Abbildung 4.1). Durch eine stärkere Bindung des HA der eigewachsenen Viren an die zellulären Rezeptoren, könnte eine höhere Neuraminidaseaktivität erklärt werden. Denn die Balance zwischen HA Bindung und NA Aktivität ist sehr wichtig für das Viruswachstum (Wagner *et al.*, 2002). Wenn eine starke Bindung des HA vorhanden ist, so ist in der Regel auch die Aktivität der Neuraminidase erhöht (Mitnaul *et al.*, 2000). Das getestete B-Virus zeigte allerdings das Gegenteil. Hier konnte bei den zellgewachsenen Viren über 500 % der Aktivität im Vergleich zu eigewachsenen Viren gesehen werden. Da keine Mutation im HA oder NA des Virus aufgetreten ist, das zellgewachsene Virus aber auf HBEC besser wächst, könnte die erhöhte Neuraminidaseaktivität durch eine veränderte Glykanstruktur in beiden Wirtssystemen bedingt sein. Es ist allerdings nur ein Influenza B Virus getestet worden, daher ist nicht klar, ob die erhöhte Aktivität bei allen Influenza B Viren der gleichen Saison zu finden ist oder dies ein singuläres Phänomen darstellt. Außerdem wurde der Mu-NANA Test auf die Viruspartikelanzahl bezogen und nicht auf die tatsächliche Neuraminidasemenge auf der Virusoberfläche. Daher sind genaue Aussagen über die Aktivitätsunterschiede schwierig. Die erhöhte NA-Aktivität kann ebenso durch Zunahme der NA Moleküle auf der Virusoberfläche zustande gekommen sein, wobei die Aktivität der einzelnen Neuraminidase aber unverändert ist.

Influenzaviren, die als klinisches Isolat keine Hühnererythrozyten agglutinieren können, entwickeln diese Fähigkeit, wenn sie längere Zeit auf MDCK Zellen passagiert wurden, auch wenn keine Mutationen auftraten (Grassauer *et al.*, 1998; Zhirnov *et al.*, 2007). Dies kann ein Indiz für unterschiedliche Glykosylierungsmuster der Virusproteine in unterschiedlichen Wirten sein. Bei den untersuchten Proben wurde keine Änderung in der Bindungsfähigkeit beobachtet, wobei Hühnererythrozyten

Diskussion

generell durch die aktuell auftretenden Virusstämme schlechter agglutiniert werden, als Säugererythrozyten (z.B. von Meerschweinchen).

Abschließend lässt sich sagen, dass die hier getesteten Viren als Ei-typisch bezeichnete Mutationen zeigten, wenn sie in Eiern passagiert wurden. Diese Mutationen waren in der Bindungstasche des HA zu finden. Aufgrund dieser Mutationen kann es zu einer Änderung der Sialinsäurepräferenz kommen (Weis *et al.*, 1988). Somit kann das Wachstum in unterschiedlichen Wirtssystemen verbessert werden. Die erwachsenen Viren zeigten niedrigere Titer auf humanen Bronchialzellen. Daraus lässt sich schließen, dass die gefundenen Mutationen und das Wachstum im Ei mit der daraus resultierenden Glykanstruktur einen Nachteil für diese Viren im humanen System bedeuten. Gleichzeitig können die Mutationen der Oberflächenproteine die Antigenität verändern und dadurch den daraus hergestellten Impfstoff ineffektiver oder sogar wirkungslos machen.

5.2 Untersuchungen eines MDCK33016 PF-basierten Donorvirus im Vergleich mit A/Puerto Rico/8/34

Für die Produktion eines Impfstoffes ist das Wachstum des Saatvirus von besonderer Bedeutung. Besseres Wachstum führt zu höheren Ausbeuten und daraus folgend können mehr Impfdosen bei gleichbleibender Produktionskapazität hergestellt werden. Die humanen Influenzaviren, welche im Impfstoff Verwendung finden, wachsen meist nicht optimal in Hühnereiern oder auf Zellen. Daher werden Reassortanten der Wildtyp-Viren mit den internen Genen eines gut wachsenden Virus hergestellt. Das Wachstum des A/Puerto Rico/8/34 Stammes, welcher von den WHO-Zentren als Donor für die Reassortierung verwendet wird, ist für das Ei-System optimal, für die MDCK Zelle hingegen nicht zufriedenstellend (Voeten *et al.*, 1999). Aus diesem Grund wurde nach einem alternativen Donorvirus gesucht, welches sehr gut an das Wachstum auf der MDCK33016 PF Zelle angepasst ist. Als Kandidat wurde das Virus NB # 105 (A/New Caledonia/20/99-like (H1N1)) ausgewählt, welches aus einer Patientenprobe der Grippesaison 2006/2007 isoliert wurde. In den Genen PA, M, HA und NA von NB # 105 kommt es im Laufe der 30 Passagen zu insgesamt sechs Mutationen. In NA und HA treten deutlich häufiger Mutationen auf als in den restlichen viralen Proteinen, da diese beiden Oberflächenproteine während der Infektion dem Selektionsdruck durch das Immunsystem ausgesetzt sind. Außerdem wird die Anpassung an neue Wirte durch das

Diskussion

Bindungsverhalten, die Spaltbarkeit von Sialinsäuren und die Antigenität durch Mutationen in diesen beiden Genen beeinflusst (Gambaryan *et al.*, 1999; Grassauer *et al.*, 1998; Meyer *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2008). Generell ist die Mutationsrate von Influenza A Viren hoch, da die Polymerase des Virus keine Korrekturlesefunktion besitzt (Nobusawa & Sato, 2006). Eine Mutationsrate konnte in diesem Fall nicht berechnet werden, da keine Klone einzelner Passagen untersucht wurden, sondern komplette Virusüberstände und somit immer nur eine Konsensus-Sequenz erfasst wurde. Es ist nicht auszuschließen, dass in diesen Überständen Quasi-Species vorhanden sind, die durch eine Sequenzierung nicht erkannt werden. Zum Beispiel konnten aus NB # 105 (Passage 30) zwei unterschiedliche Plasmide für das Matrixprotein generiert werden. Eines besitzt 95R, während das andere Plasmid 95K aufweist. Matrixproteine mit beiden Aminosäuren müssen in der Virussuspension der Passage 30 vorhanden gewesen sein. Bei der Sequenzierung von NB # 105 p30 wurde nur die vorherrschende Sequenz vervielfältigt und sequenziert.

Die verschiedenen Mutationen des NB # 105 liegen in Genen, die für verschiedene Funktionen des Virus von Bedeutung sind. Die Mutation des M Proteins (R95K) bewirkte eine Veränderung der Virusmorphologie. Sie ist verantwortlich für eine sphärische Morphologie der Influenzaviruspartikel von NB # 105 nach der Passage 5. In der Literatur wurden Virusmutanten mit K95A beschrieben, welche deutlich größere ungleichmäßig geformte Viruspartikel im Vergleich zum Wildtypvirus zeigten (Burleigh *et al.*, 2005). Die AS K95 und D204 alleine reichen aus, um nur noch sphärische Viruspartikel zu erhalten (Bourmakina & Garcia-Sastre, 2003). Auch die Wirtszelle kann Einfluss auf die Bildung filamentöser Partikel haben. Mutationen in unterschiedlichen Bereichen des M Proteins können zu einer Änderung der Morphologie in unterschiedlichen Wirtszellen führen (Elleman & Barclay, 2004). Frisch isolierte Stämme weisen meist eine filamentöse Morphologie auf, während diese bei Laborstämmen nach einigen Passagen in Eiern oder Zellen verloren geht (Choppin *et al.*, 1960). NB # 105 zeigte deutlich mehr sphärische Viruspartikel, wenn an Position 95 ein Lysin statt eines Arginin vorhanden war. Die Partikel von NB # 105 der ersten Passage sind teilweise weit über 1000 nm lang, während in der 6. Passage hauptsächlich sphärische Partikel gefunden wurden. Die wenigen filamentösen Partikel waren deutlich kürzer als direkt nach Isolation. Die Viren der Passage 6 ähneln stark denen des Laborstammes PR8 NYMC.

Diskussion

Die beiden gefundenen Mutationen des NB # 105 im PA (V91I und R185K) befinden sich an Stellen, die in der Literatur nicht als kritisch oder konserviert beschrieben sind (Hara *et al.*, 2006; Regan *et al.*, 2006). Durch die Mutationen wurden Aminosäuren mit vergleichbaren Eigenschaften ausgetauscht. Eventuell kann durch den Austausch dieser AS die Faltung von PA verändert worden sein, was sich positiv auf die Funktion von PA ausgewirkt haben kann, indem für die Transkription und Replikation wichtige AS leichter zugänglich werden.

Das HA von NB # 105 weist zwei Mutationen auf (D225G und T231N (H3 Nummerierung)), welche sich im 220 Loop (AS 220 – 230) der Rezeptorbindungsstelle und direkt dahinter befinden. Eine Mutation im HA D225G wurde in Zusammenhang mit einer Änderung der Rezeptorspezifität gebracht. Ein HA mit D 225 und zusätzlich S186 erkennt α 2-6 gebundene und ein HA mit G225 sowie P186 α 2-3 gebundene Sialinsäuren (Skehel & Wiley, 2000). Bei NB # 105 ist von Beginn an Prolin an Position 186, aber an Position 225 Asparaginsäure. Daher werden wahrscheinlich beide Sialinsäurebindungen nicht optimal erkannt. MDCK Zellen besitzen sowohl α 2-6 gebundene als auch α 2-3 gebundene Sialinsäuren auf der Zelloberfläche. Daher führt diese Präferenz nicht zu einem Wachstumsnachteil für NB # 105 auf der Zelle. Die Mutation an AS 225 tritt schon in Passage fünf auf, wodurch NB # 105 vollständig α 2-3 gebundene Sialinsäuren bevorzugen sollte. Für die Zellen ist dies scheinbar nicht von Nachteil, da das Virus auf den Zellen trotzdem zu hohen Titern heranwächst. Diese Mutation erklärt, warum NB # 105 auch in Eiern zu hohen Titern wachsen kann. Generell infizieren humane Viren in den ersten Passagen Eier nicht gut, da sie sich erst an den neuen Wirt anpassen müssen (Williams & Robertson, 1993). Der zweite AS Austausch T231N liegt am Rand des 220 Loop und kann dadurch eventuell dazu beitragen die Erkennung der Sialinsäuren zu verändern. Trotz der aviären Sialinsäurepräferenz scheint NB # 105 eine Genkombination zu besitzen, welche vorteilhaft für das Wachstum, sowohl auf der MDCK33016 PF Zelle als auch in Eiern, ist.

Die Neuraminidaseaktivität des Virus nimmt nach der ersten Passage leicht ab, obwohl nur eine Mutation in der Neuraminidase in der Passage 20 zu sehen ist. Eine Änderung der Aktivität kann nicht in direkten Zusammenhang mit der Mutation gebracht werden. Bei der NA Aktivität spielt das Glykosylierungsmuster eine Rolle (Alymova *et al.*, 1998; Aymard *et al.*, 1996), welches durch verschiedene Wirtssysteme verändert wird. Eine Veränderung der Menge der Neuraminidase auf der

Diskussion

Virusoberfläche ist unwahrscheinlich, da die Viren nicht in anderen Wirtssystemen passagiert wurden.

Ein Großteil der Mutationen von NB # 105 lassen darauf schließen, dass sie zu einer Anpassung an die MDCK33016 PF Zelle geführt haben. Das ohnehin schon gute Wachstum konnte so ideal an den Wirt angepasst werden. Mutationen in Genregionen, die nicht als kritisch beschrieben sind, können trotz allem zu einer verbesserten Interaktion der viralen Gene untereinander und somit zu verbessertem Wachstum führen.

5.2.1 Wachstumsverhalten von NB # 105 im Vergleich zu A/Puerto Rico/8/34

NB # 105 soll PR8 NYMC als Donorvirus für zellkulturbasierten Reassortanten ersetzen. Daher ist es wichtig diese Viren in ihrem Wachstumsverhalten auf der MDCK33016 PF Zelle zu vergleichen. PR8 RKI, welches zu höheren Titern auf der MDCK33016 PF Zelle wächst, wurde ebenfalls mit NB # 105 und PR8 NYMC verglichen. Die getesteten Viren zeigten unterschiedliches Wachstumsverhalten auf der MDCK33016 PF Zellsuspension. Das Virus NB # 105 wuchs am schnellsten zu hohen Titern heran. Ein Sequenzvergleich der drei verwendeten Viren (PR8 NYMC, PR8 RKI und NB # 105) ergab mehr als 20 Unterschiede in allen viralen Genen. Selbst beide PR8 Viren zeigten im Vergleich deutliche Unterschiede und gehören unterschiedlichen Linien an (PR8 NYMC: Mount Sinai Linie, PR8 RKI: Cambridge Linie).

Verschiedenste Mutationen in unterschiedlichen Genen können zu Wachstumsveränderungen in bestimmten Wirten führen. Bei den gefundenen Unterschieden in NB # 105 und PR8 ist es schwer, eine eindeutige Aussage zu treffen, worin das bessere Wachstum des NB # 105 begründet ist. Ein AS-Austausch Y360S im PB2 allein führt zu deutlich schlechterem Wachstum verschiedener PR8 Viren auf MDCK Zellen (Murakami *et al.*, 2008). Diesen Austausch besitzt PR8 NYMC im Gegensatz zu NB # 105 und PR8 RKI, welche Tyrosin 360 besitzen. Letzteres zeigt besseres Wachstum auf der MDCK33016 PF Zelle im Vergleich zu PR8 NYMC. Durch den großen Sequenzunterschied ist es unwahrscheinlich, dass eine einzige Mutation für das unterschiedliche Wachstum der drei Viren verantwortlich ist.

Influenza A Viren wachsen besser auf Zellen, je länger die Stielregion des NA ist (Murakami *et al.*, 2008). Dies kann ein Grund für die höheren Titer des NB # 105 sein, da dort die Stielregion des NA 15 AS länger ist als bei beiden PR8. Es wurde beschrieben, dass die Glykosylierung des HA an bestimmten Aminosäuren zusammen mit der Stiel-

Diskussion

länge des NA einen wichtigen Einfluss auf das virale Wachstum auf MDCK Zellen hat (Zhirnov *et al.*, 2009). Wenn Viren zum Beispiel eine Glykosylierungsstelle an Position 158 im HA besitzen, ist eine effiziente Replikation mit einem kurzstielligen NA möglich. Ist diese Glykosylierungsstelle nicht vorhanden, ist ein NA mit langer Stielregion von Vorteil. Weder NB # 105 noch PR8 NYMC oder PR8 RKI besitzen im HA Glykosylierungsstellen an Position 158. Ein verbessertes Wachstum von NB # 105 kann durch die längere Stielregion des NA erklärt werden. PR8 RKI wächst auf der MDCK33016 PF Zelle vergleichbar mit PR8 NYMC, zeigt jedoch nach 72 Stunden höhere Titer.

Mehrere Glykosylierungsstellen in der Stielregion schützen das NA vor proteolytischer Spaltung (Xu *et al.*, 2008). NB # 105 in der Passage 30 besitzt eine potentielle Glykosylierungsstelle mehr in der Stielregion als beide PR8 Viren. PR8 RKI besitzt eine Glykosylierungsstelle mehr als PR8 NYMC an Position 146. Vielleicht bietet dies PR8 RKI und NB # 105 Wachstumsvorteile gegenüber PR8 NYMC. Im Laufe der Passagierung (Passage 20) verliert NB # 105 an AS 70 eine Glykosylierungsstelle. Diese Position liegt in der Stielregion des NA. Der Verlust der Glykosylierungsstelle war für das Viruswachstum nicht störend.

Veränderungen der Polymerase und des NP bestimmter PR8 Varianten rufen besseres Wachstum in Eiern hervor (Horimoto *et al.*, 2007). Ein Austausch von NS einer schlecht wachsenden PR8 Variante mit denen einer gut wachsenden führt zu deutlich höheren Plaquetitern, zeigt aber keine höhere Infektiösität in Eiern (Egg infectious dose (EID) 50) (Horimoto *et al.*, 2007). PR8 NYMC zeigte in den Polymerasegenen und dem NP die Aminosäuren, welche für das Virus mit dem besseren Wachstum stehen. PR8 RKI hingegen besitzt die AS für das schlechter wachsende Virus. Diese Ergebnisse widersprechen denen in dieser Arbeit erzielten Wachstumskurven. Es ist jedoch noch sehr wenig über das komplette Zusammenspiel aller Gene der Influenzaviren bekannt. Es muss eine ausgewogene Balance zwischen allen Influenzavirus Genen für eine produktive Infektion erreicht werden (siehe 5.2.4).

5.2.2 Wachstumsverhalten der Viren NB # 105, PR8 NYMC und PR8 RKI unter Zugabe des Inhibitors U0126

Die Raf/MEK/ERK-Signalkaskade gehört zur Familie der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Kaskaden. Die Bedeutung dieser Kaskaden liegt darin

Diskussion

extrazelluläre Signale in zelluläre Reaktionen umzusetzen. Ras (Rat sarcoma) und Protein Kinase C (PKC) werden durch Zytokine, Wachstumsfaktoren oder virale Infektionen aktiviert und phosphorylieren ihrerseits Raf (rapidly growing fibrosarcoma) welches wiederum MEK 1/2 phosphoryliert. ERK 1/2 (Extracellular signal-regulated kinase) wird von den phosphorylierten MEK (MAP/ERK Kinase) aktiviert und gelangt in den Zellkern, wo es als Transkriptionsfaktor wirkt und Proliferation sowie Zelldifferenzierung reguliert. Die ERK Aktivierung während der produktiven Influenzavirusinfektion führt zu virusinduzierter Cytokinproduktion und Atemwegsentzündung (Mizumura *et al.*, 2003), zur selben Zeit scheint die virale Replikation unterstützt zu werden (Pleschka *et al.*, 2001).

Während der Influenzavirusinfektion kommt es zu zwei Phasen der Aktivierung von ERK (Pleschka *et al.*, 2001). Die erste Aktivierung erfolgt bis 30 Minuten nach der Infektion und könnte dabei die Freisetzung der Gensegmente aus dem endosomalen Kompartiment oder der Bindung des Virus an der Zelloberfläche bedingen, welche wiederum von der Protein Kinase C (PKC) beeinflusst wird. Überdies wird das NS1 Protein durch ERK und die cyclin-abhängige Kinase (CDK) am Threonin 215 phosphoryliert. Eine Substitution dieser Aminosäure führt zu verminderter Virusvermehrung im Frühstadium der Infektion (Hale *et al.*, 2009). Dies kann nicht für den Wachstumsunterschied verantwortlich sein, da alle drei Viren das Threonin 215 besitzen. Die Aktivierung zwischen 4 und 10 Stunden nach der Infektion wird durch das neu synthetisierte HA an der Zellmembran ausgelöst und unterstützt die Freisetzung von neusynthetisierten viralen RNPs vom Kern ins Zytoplasma (Ludwig *et al.*, 2004; Pleschka *et al.*, 2001). Die Inhibition des ERK Weges führte zur Zurückhaltung der viralen RNP-Komplexe im Zellkern während der späten Phase des Replikationszyklus. Die späte ERK Aktivierung wird durch die Assoziation von HA Proteinen mit Lipid rafts und somit durch die PKC α herbeigeführt (Marjuki *et al.*, 2006). Diese Aktivierung könnte eine Autoregulation darstellen, welche den RNP Export zu einem Zeitpunkt koordiniert, in dem alle viralen Komponenten für die Knospung bereit sind (Pleschka, 2008). Im Rahmen der Vorversuche ergab sich, dass bei Infektion mit PR8 NYMC und PR8 RKI nach einer und nach 8 Stunden die pERK Banden stärker als in den dazwischen liegenden Zeiträumen ausgeprägt waren. Da in den weiteren Versuchen erst nach 8hpi die erste Probe genommen wurde, konnte dies dort nicht mehr untersucht werden.

Eine Inhibition der ERK Phosphorylierung durch bestimmte Stoffe wirkt sich negativ auf das Viruswachstum aus (Ludwig *et al.*, 2004; Pleschka *et al.*, 2001). NB # 105 schien

Diskussion

die Phosphorylierung von ERK während der Infektion im Vergleich zur uninfizierten Kontrollprobe herunter zu regulieren. Daher sollte untersucht werden, ob dieses Virus einen Wachstumsvorteil durch die Inhibition des ERK Weges hat. Durch eine Inhibition der Phosphorylierung durch U0126 wuchs NB # 105 um eine Log Stufe schlechter als ohne den Inhibitor. Diese Beobachtung lässt sich nur bei hohen Konzentrationen des Inhibitors zeigen, was auch mit den Ergebnissen von Pleschka 2008 korreliert. Die Inhibition ist dosisabhängig und nimmt mit steigender Inhibitorkonzentration zu. Bei einer 140fachen IC50 (10 µM) zeigte keines der drei Viren Wachstumsnachteile gegenüber Kontrollen ohne Inhibitor, obwohl keine ERK Phosphorylierung mehr nachgewiesen werden konnte. Die Berechnung der IC50 wird mit aufgereinigtem Inhibitor durchgeführt und spiegelt nicht die Verhältnisse in der Zellsuspension wieder, daher können durchaus höhere Konzentrationen des Inhibitors benötigt werden, um in der Zelle selbst eine ausreichende Konzentration zu erreichen. Eventuell kommt es noch zu einer Aktivierung, die unter der Detektionsgrenze liegt oder die eingesetzte Virusmenge „überrennt“ die Inhibition und nutzt alternative Wege, um die benötigten Gene zu regulieren. Der Inhibitor selbst wurde in hohen Dosen als nicht toxisch für die Zellen getestet (Ludwig *et al.*, 2004). Die Aktivierung des ERK Weges ist bei einer Influenzavirusinfektion von großer Bedeutung. Daher wird dieser Weg bei Influenzavirusinfektionen bei einer produktiven Infektion in Säugern aktiviert und spielt auch eine wichtige Rolle im aviären System (Xing *et al.*, 2010).

Zu verschiedenen Zeitpunkten scheint NB # 105 die ERK im Vergleich zu uninfizierten Kontrollproben herunter zu regulieren. Dieser Eindruck kann entstehen, wenn Zellen der Zellsuspension in unterschiedlichen Wachstumsphasen vorhanden sind. Dadurch kommt es zu einem Basislevel der ERK Aktivierung. Bei anschließender Infektion kann es zu Unterschieden der Phosphorylierung von ERK kommen. NB # 105 wächst aber von den drei getesteten Viren am besten, demzufolge sollte bei einer produktiven Infektion die ERK Phosphorylierung gesteigert sein. PR8 RKI wuchs deutlich besser als PR8 NYMC und aktivierte ERK stärker als PR8 NYMC. Das Zusammenspiel der viralen Gene mit den zellulären Faktoren spielt bei der Influenzavirusinfektion eine wichtige Rolle. Da sich alle drei Viren in allen Genen deutlich unterscheiden, kann das NB # 105 vielleicht einen Vorteil daraus ziehen, ERK weniger stark zu aktivieren. PR8 NYMC indes, welches die Phosphorylierung nicht signifikant steigert, scheint dadurch einen Wachstumsnachteil zu erleiden.

5.2.3 Neuraminidaseaktivität des Virus NB # 105 während des Wachstums auf MDCK33016 PF Zellen im Vergleich zu PR8 NYMC und PR8 RKI

Zum weiteren Vergleich der Viren NB # 105, PR8 NYMC und PR8 RKI wurde die Neuraminidaseaktivität mit einem Mu-NANA Test untersucht. PR8 NYMC zeigt die niedrigste Neuraminidaseaktivität der drei Viren. PR8 RKI zeigte eine deutlich gesteigerte NA-Aktivität im Vergleich zu den beiden anderen Viren. Die NA-Aktivität des NB # 105 liegt höher als die von PR8 NYMC, jedoch niedriger als die von PR8 RKI.

Die hohe Neuraminidaseaktivität des PR8 RKI kann damit zusammenhängen, dass das HA dieses Virus besser an die Sialinsäuren auf der Zelloberfläche binden kann. Je geringer die Glykosylierung des HA um die Bindungstasche herum ist, desto stärker kann es an die zellulären Rezeptoren binden (Ohuchi *et al.*, 1997). PR8 RKI hat im HA einige Glykosylierungsstellen weniger als NB # 105 (A.2), deshalb könnte das HA von PR8 RKI stärker an die zellulären Rezeptoren binden. Im Ausgleich dazu sollte das NA aktiver sein, um eine produktive Infektion hervorzurufen, denn die Bindungsfähigkeit von HA und die Spaltungsaktivität des NA stehen in Balance zueinander (Wagner *et al.*, 2000). Die höhere NA-Aktivität zusammen mit weniger potentiellen Glykosylierungsstellen könnte ein Faktor für besseres Wachstum des PR8 RKI gegenüber PR8 NYMC sein. Die niedrige NA-Aktivität von PR8 NYMC könnte nicht ausreichend sein, um die Stärke der Bindung des HA zu kompensieren. NB # 105 hat einige Glykosylierungsstellen mehr und benötigt deshalb eventuell keine so starke Neuraminidaseaktivität, da das HA nicht so stark an Sialinsäuren bindet. Die Stiellänge der Neuraminidase spielt im Zusammenhang mit der Neuraminidaseaktivität eine wichtige Rolle. Je länger der Stiel, desto aktiver ist die Neuraminidase (Wagner *et al.*, 2000), was zu besserer Replikation führen kann (Castrucci & Kawaoka, 1993). Das Verhalten von PR8 NYMC und NB # 105 entspricht dieser Feststellung. PR8 NYMC besitzt ein NA mit kurzem Stiel, hat eine deutlich niedrigere NA-Aktivität und repliziert schlechter als NB # 105, welches ein NA mit längerem Stiel besitzt. PR8 RKI besitzt allerdings auch ein NA mit einem kurzen Stiel. Aviäres NA besitzt einen kurzen Stiel, benötigt aber eine Glykosylierung des HA an AS 158 für eine effiziente Replikation in MDCK Zellen (Zhirnov *et al.*, 2009). Zwischen den HAs der beiden PR8 Viren gibt es allerdings keinen Unterschied in potentiellen HA Glykosylierungsstellen. Das Zusammenspiel der HA und NA Proteine wird bei NB # 105 optimal an das Wachstum

Diskussion

auf die MDCK33016 PF Zelle angepasst sein, während beide PR8 Viren eher an das Wachstum in Hühnereiern adaptiert sind.

5.2.4 Untersuchung der Polymeraseaktivität von NB # 105 und PR8 NYMC

Die Polymerasekomplexe (PA, PB1, PB2 und NP) des PR8 NYMC und NB # 105 unterscheiden sich in mehreren Aminosäuren voneinander. Da das PR8 NYMC ein Laborstamm ist, der 1934 isoliert wurde, während NB # 105 in der Grippesaison 2006/2007 aus einer Patientenprobe isoliert wurde, war dieser Unterschied zu erwarten. Durch Untersuchungen der Polymeraseaktivität konnte gezeigt werden, dass PA und NP von NB # 105 jeweils einzeln die Aktivität des Polymerasekomplexes von PR8 NYMC deutlich steigern konnten. Wurden die beiden Gene dagegen zusammen getestet, war sogar eine geringe Abnahme der Aktivität zu sehen. Ein Austausch der Gene des Polymerasekomplexes von NB # 105 mit denen von PR8 NYMC konnte keine Aktivitätssteigerung erzielen, gleich welche Gene von PR8 NYMC genutzt wurden. Die Polymerase von NB # 105 ist durch Klonierung auf der MDCK33016 PF Zelle optimal daran angepasst, daher hat sich sehr wahrscheinlich ein optimales Zusammenspiel zwischen den einzelnen Polymerasegenen entwickelt. PR8 NYMC hingegen wurde für das Wachstum in Hühnereiern etabliert, deshalb ist es möglich, dass der Polymerasekomplex von PR8 NYMC auf Zellen zu hohe Aktivitäten zeigt, um eine effiziente Replikation zu gewährleisten.

Der Polymerasekomplex spielt eine wichtige Rolle für die Pathogenität von Influenza A Viren in Säugern. Ein Aminosäureaustausch an Position E627K im PB2 eines H5N1 Isolates von 1997 zeigt trotz gleich bleibendem Tropismus eine gesteigerte Pathogenität in Mäusen gegenüber dem Ursprungsvirus (Hatta *et al.*, 2001; Subbarao *et al.*, 1998). Zudem waren drei Aminosäureaustausche in PB1 für gesteigerte Pathogenität in Frettchen verantwortlich (Salomon *et al.*, 2006). Die LD50 verschiedener Polymerasemutanten in Mäusen korreliert außerdem mit der Polymeraseaktivität (Gabriel *et al.*, 2005). Diese Daten lassen vermuten, dass Veränderungen der Polymerase wichtig für die Adaptation an das Säugersystem sind, da dies vielleicht zu einer besseren Interaktion der Polymeraseproteine untereinander oder auch mit Wirtsproteinen führen kann. Ein Zusammenspiel einzelner Aminosäureaustausche kann die Steigerung der Polymeraseaktivität hinsichtlich Transkription und Replikation bedingen. Allerdings wurden bei o.g. Tests verstärkt die Austausche im PB1 (L13P und S678N) und PB2 (T333I, E627K, D701N und S714R) gezeigt. PB1 und PB2 zeigten mit NB # 105 und

Diskussion

PR8 NYMC keinen Aktivitätsunterschied. Ein Austausch im PA Gen (N615R) ist wichtig für einen Wirtswechsel vom Vogel zum Säuger. Auch im Cluster humaner Isolate ist 615R zu finden (Gabriel *et al.*, 2005). Diese AS kann man bei NB # 105 finden, bei PR8 NYMC befindet sich an Position 615 ein K. Auf Säugerzellen kann 615R einen Vorteil für das Wachstum darstellen, auch wenn der gesamte Polymerasekomplex von NB # 105 weniger aktiv als der von PR8 NYMC ist.

Das NP Protein der Influenzaviren muss oligomerisieren, um funktionell zu sein. Es kommt zu Wechselwirkung zwischen den verschiedenen NP Molekülen (Ye *et al.*, 2006). Einige der an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren zeigen Unterschiede zwischen NB # 105 (N334, T408, K422, E455) und PR8 (H334, I408, R422, D455). Durch diese AS Austausche könnte es zu verbesserter Wechselwirkung der NP Proteine kommen, die zu einer Aktivitätssteigerung des Polymerasekomplexes führt. In der RNA-Bindetasche von NP finden sich zwischen NB # 105 und PR8 NYMC keine AS Austausche. Eine erhöhte Polymeraseaktivität lässt allerdings nicht auf besseres Wachstum der Viren auf MDCK33016 PF Zellen schließen. Damit das Wachstumsverhalten dieser Viren untersucht werden konnte, wurden Viren hergestellt, welche PR8 NYMC als Donor und NB # 105 PA, NP alleine oder PA und NP in Kombination besitzen. Diese drei Viren wachsen 1,5 Log Stufen schlechter als RG 105p30. Dies zeigt, dass eine erhöhte Polymeraseaktivität allein keine Vorteile für das Viruswachstum bringt. Die Viren RG PR8 mit 105p30 PA und RG PR8 mit 105p30 NP wachsen zu gleichen Titern wie das Virus RG PR8 mit 105p30PA/NP. Es werden durch die Austausche der Polymerasegene von PR8 NYMC deutlich mehr defekte Partikel gebildet, was im Vergleich der RTD-PCR Werte mit den infektiösen Titern sichtbar ist. Schon von vornherein scheinen deutlich mehr defekte Partikel im Virusüberstand von RG PR8 mit 105p30 PA, RG PR8 mit 105p30 NP, RG PR8 mit 105p30 PA/NP vorhanden zu sein. Die RTD-PCR detektiert bei diesen Viren bereits nach einer Stunde Viruspartikel. Dies können nur defekte Partikel sein, die schon als Inokulum auf die Zellen gebracht wurden, denn nach einer Stunde können sich die Viren nicht zu solch hohen Titern vermehrt haben. Das schlechtere Wachstum kann darauf zurückzuführen sein, dass in diesen Proben sehr viele interferierende Partikel vorhanden sind, die nicht infektiös sind, aber die Infektion stören.

Mutationen in PA (R638A) können dazu führen, dass zwar gleiche Mengen an vRNA, cRNA und mRNA gebildet werden, aber deutlich weniger Vollängen RNA-Produkte. Dies führt zur vermehrten Bildung von DIPs (defective interfering particles) (Fodor *et al.*,

Diskussion

2003). PA von PR8 NYMC und PA von NB # 105 zeigen an Position 638 keinen Unterschied, besitzen aber insgesamt 27 Aminosäureaustausche. Eventuell kann ein Austausch an anderer Stelle zu Veränderung der RNA Bindung führen. Das NS Gen kann dazu beitragen, dass nur verkürzte Formen des PA gebildet werden, was wiederum die Bildung von DIPs hervorruft (Odagiri & Tobita, 1990). Eine zu hohe Polymeraseaktivität kann zu einem Ungleichgewicht zwischen Replikation und Transkription führen und so auch die Infektivität des Virus mindern. Ferner führt eine hohe Polymeraseaktivität in Mäusen zu verminderter Virulenz (Gabriel *et al.*, 2005). Das Wechselspiel zwischen den einzelnen viralen Proteinen ist von Bedeutung für das Viruswachstum auf einem bestimmten Wirtssystem. Die RG PR8 mit 105p30 PA, NP oder PA/NP zeigen vergleichbares Wachstum, auch wenn sich die Polymeraseaktivität der verschiedenen Genkombinationen im Luciferasetest deutlich unterscheidet.

5.2.5 Vergleiche des Wachstumsverhaltens der durch Reversen Genetik hergestellten

Viren

Ein optimaler Donorstamm soll interne Gene besitzen, welche den Viren optimales Wachstum in einem bestimmten Wirtssystem unabhängig der Oberflächenproteine HA und NA ermöglichen. Veränderte HA und NA Gene sollten keinen Wachstumsnachteil für das Donorvirus bringen. Es wurden Viren mit unterschiedlichen HA und NA Genen hergestellt, um das Wachstum von PR8 NYMC und NB # 105 mit anderen Oberflächenproteinen zu untersuchen. Die RG Viren mit kompletten NB # 105 Plasmiden zeigten ein etwas schlechteres Wachstum als das RG PR8, was konträr zum Wachstum von NB # 105 und PR8 NYMC ist. Bei einem Vergleich der beiden PR8 Viren (PR8 NYMC und RG PR8) wächst RG PR8 zu 1-2 Log Stufen höheren Titern als PR8 NYMC. Dieser Unterschied könnte damit erklärt werden, dass in dem Virusüberstand von PR8 NYMC mehrere genetisch unterschiedliche Varianten des PR8 Virus vorhanden sein können. Dieses Virus wurde nicht plaqueaufgereinigt. Allerdings kann man im Plaquetest gut sehen, dass unterschiedlich schnell wachsende PR8 NYMC Viren in der Suspension vorhanden sind. Es finden sich sowohl langsamer wachsende Viren (kleine Plaques) als auch schneller wachsende (große Plaques). Für die Generierung von RG PR8 wurde ein Plasmid des PR8 NYMC verwendet, welches Gene eines schneller wachsenden PR8 „Klones“ widerspiegeln könnte. Daher kann sich das Wachstum von PR8 NYMC und RG PR8 deutlich unterscheiden. RG 105p30 und NB # 105 zeigten kaum

Diskussion

Wachstumsunterschiede. Die Viren mit NB # 105 als Donor mit verschiedenen H1 und N1 Genen zeigten vergleichbares Wachstum, welches 2 Log Stufen niedriger war als bei RG 105p30. RG 105p30 + A/Uruguay/716/07 (H3N2) zeigte vergleichbares Wachstum mit RG 105p30, wuchs sogar schneller zu höheren Titern. Mit PR8 NYMC als Donor waren deutliche Unterschiede im Wachstum der Viren mit unterschiedlichem HA und NA zu sehen. RG PR8 + 105p30 HA/NA zeigte um eine Log Stufe vermindertes Wachstum zu RG PR8. Das Virus mit dem HA und NA von A/California/07/09 zeigte bis zu 6 Log Stufen schlechteres Wachstum als RG PR8. RG PR8 + A/Uruguay/716/07 HA/NA zeigte ebenfalls schlechteres Wachstum als RG PR8. Eventuell sind die für die Transfektion von PR8 NYMC verwendeten Plasmide nicht ideal für das Uruguay HA/NA. Daher wächst dieses Virus schlechter als die klassische Reassortante X175C SSV0811. Das Wachstum der pandemischen H1N1 Viren konnte durch den zusätzlichen Austausch des PB1 des pandemischen H1N1 deutlich verbessert werden (X179A SSV0906). Ähnliche Ergebnisse sind mit dem pandemischen HA/NA bei der Reassortierung mit PR8 schon gezeigt worden (Wanitchang *et al.*, 2010). Die klassische Reassortante, welche im pandemischen Impfstoff Verwendung gefunden hat, ist eine Reassortante mit dem Donor PR8 und HA/NA sowie PB1 von A/California/07/09 (A/reassortant/NYMC X-179A entspricht X179A SSV0906). PB1 ist das einzige humane Gen des pandemischen H1N1 Virus (Neumann *et al.*, 2009). Es stammt ursprünglich von einem H3N2 Virus. NB # 105 wurde in der Grippesaison 2006/2007 von humanen Proben isoliert, daher könnten dessen Polymerasegene denen des pandemischen H1N1 ähnlicher sein, als die des Laborstammes PR8, welcher 1934 isoliert wurde (Francis, Jr., 1934; Francis & Magill, 1935). Auch bei der Herstellung einer Reassortante für H5N1 konnte gesehen werden, dass eine Reassortante mit nur HA und NA nicht das beste Wachstum zeigt (Horimoto & Kawaoka, 2009). Das Wachstum konnte durch zusätzliche Verwendung des NA von PR8 verbessert werden. Schon die Verwendung verschiedener PR8 Varianten in einer Reassortierung konnte bei so entstandenen Viren zu einer Wachstumsänderung führen (Horimoto *et al.*, 2007). RG 105p30 + Uruguay/716/07 HA/NA wuchs zu, mit dem RG PR8 und X175C SSV0811, vergleichbaren Titern. Daher ist NB # 105 auch als Donorvirus für die Generierung von H3N2 Viren geeignet. RG 105p30 wuchs mit einer leichten Verzögerung, zeigte aber im End-Titer keinen Unterschied zu den restlichen Viren.

Im Vergleich der infektiösen Viruspartikel mit der Gesamtviruspartikelzahl ist bei den verschiedenen Reassortanten wieder ein großer Unterschied zu erkennen. PR8 zeigt

Diskussion

von den getesteten Viren das beste Verhältnis zwischen infektiösen und nicht infektiösen Partikeln (bis 1.6 % infektiöse Partikel), während RG 105p30 maximal 0.4 % infektiöse Partikel erreicht. Bei den anderen Reassortanten liegt dieser Anteil zwischen 0,3 und 0.1 %. Infektiöse Partikel bilden bei Influenzaviren generell den kleinsten Anteil an den Gesamtpartikeln. Im Überstand finden sich auch immer nicht infektiöse, biologisch aktive Partikel, welche aus defekten Partikeln (DIP) und nicht infektiösen zelltötenden Partikeln (niCKP) bestehen (Marcus *et al.*, 2009). Einige dieser Partikel können die Virusinfektion durch Induktion der Immunantwort oder Konkurrenz um Rezeptoren stören, auch wenn sie nicht infektiös sind. Der Anteil nicht infektiöser Partikel hängt mit dem Zusammenspiel der einzelnen Gene der Viren zusammen. Vor allem die Polymerasegene spielen eine wichtige Rolle (Fodor *et al.*, 2003). PR8 und NB # 105 unterscheiden sich in allen Genen so stark voneinander, dass Veränderungen eines Gens oder der Oberflächenproteine deutliche Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten und die infektiösen Partikel haben kann.

Nicht immer wachsen Viren mit fremden HA und NA optimal. In manchen Fällen müssen ein oder mehrere weitere Gene des Wildtypvirus in die Reassortanten mit eingebracht werden, um ein optimales Wachstum zu gewährleisten. Bei der klassischen Reassortierung werden Viren generiert, welche optimale Genkombinationen in dem verwendeten Wirtssystem besitzen. Für die Herstellung von Reassortanten durch reverse Genetik müssen verschiedene Genkombination getestet und untersucht werden, um zu bestimmen welche Kombination für das Wachstum des Virus am Vorteilhaftesten ist. Zur weiteren Evaluierung des neuen Donorstammes NB # 105 sollten zusätzlich Untersuchungen mit der klassischen Reassortierung durchgeführt und optimale Bedingungen gefunden werden. Mit diesem Virus können zurzeit nur H3N2 Viren in der klassischen Reassortierung verwendet werden, da die Oberflächenproteine des Donorvirus mit spezifischen Antisera unterdrückt werden, welche HA und NA des Wildtyp-Virus nicht hemmen sollten. Daher benötigt man für die Reassortierung von H1N1-Stämmen H3N2-Donorstämme und für die Generierung von H3N2-Reassortanten H1N1-Donorstämme.

6 Zusammenfassung

In der Influenza-Impfstoffproduktion ist es von essentieller Bedeutung, gewünschte Antigene (Hämagglutinin und Neuraminidase) in möglichst kurzer Zeit zu erhalten, damit die Bevölkerung gegen die kommenden Influenzaviren schnell und bestmöglich geschützt ist. Derzeit werden die Saatviren in Eiern hergestellt. Dem Wechsel vom humanen Wirt auf Eier folgen bei vielen Viren Mutationen in den beiden Oberflächenproteinen HA und NA. Diese Veränderungen konnten während der Passagierung von humanen Influenzaisolaten in Eiern gesehen werden. Je weniger Veränderungen die Viren zu humanen Isolaten aufweisen, desto besser kann der spätere Impfstoff schützen, daher ist die Verwendung von Säugerzellen für die Impfstoffproduktion von Vorteil.

Weiterhin ist es wichtig, Impfstoff in ausreichenden Mengen zu Beginn einer jeden neuen Grippezeit verfügbar zu haben. Um ein schnelles und ertragreiches Viruswachstum zu erzielen, ist die Verwendung eines Donorvirus, dessen positive Wachstumseigenschaften auf ein Impfvirus übertragen werden, von besonderer Bedeutung. Dazu ist das Wachstum des Donorstammes im verwendeten Wirtssystem entscheidend. Durch mehrfache Passagierung eines Virus aus einer Patientenprobe wurde ein für die MDCK Zelle passendes Donorvirus (NB # 105) etabliert. Die Morphologie des Virus änderte sich während der Passagierung vom filamentösen Wildtyp-Charakter hin zu sphärischen Partikeln. Außerdem zeigten sich Mutationen im HA, welche die Präferenz des Virus zu α 2-3 Sialinsäurebindung änderten. Daher wächst NB # 105 deutlich besser und schneller als der bisher verwendete Donorstamm PR8 NYMC sowohl auf der MDCK33016 PF Zelle als auch in Eiern. PR8 RKI zeigte höhere Titer als PR8 NYMC, aber niedrigere Titer als NB # 105. Eine Untersuchung der NA-Aktivität lässt den Rückschluss zu, dass NB # 105 eine optimale Balance zwischen NA-Aktivität und HA-Bindung besitzt, welche beide PR8 Viren nicht erreichen. Durch die hohen Titer, sowohl auf der MDCK33016 PF Zelle als auch in Eiern, könnte man NB # 105 für die Reassortierung in diesen Systemen verwenden. Austausche des HA und NA in einem RG System zeigten, dass sich NB # 105 als Donorvirus zur Herstellung von Reassortanten mit H1N1 und H3N2 Viren eignet, und dass für einige HA/NA Kombinationen (A/California/07/09 und A/Uruguay/716/07) zu höheren Titern wachsende Reassortanten generiert werden konnten als mit dem Laborstamm PR8 NYMC.

Literaturverzeichnis

- Alymova, I. V., Kodihalli, S., Govorkova, E. A., Fanget, B., Gerdil, C. & Webster, R. G. (1998).** Immunogenicity and protective efficacy in mice of influenza B virus vaccines grown in mammalian cells or embryonated chicken eggs. *J Virol* **72**, 4472-4477.
- Anwar, T., Lal, S. K. & Khan, A. U. (2006).** In silico analysis of genes nucleoprotein, neuraminidase and hemagglutinin: a comparative study on different strains of influenza A (Bird flu) virus sub-type H5N1. *In Silico Biol* **6**, 161-168.
- Audsley, J. M. & Tannock, G. A. (2004).** The role of cell culture vaccines in the control of the next influenza pandemic. *Expert Opin Biol Ther* **4**, 709-717.
- Aymard, M., Gerentes, L., Valette, M., Million-Jolly, J., Lina, B., Kessler, N., Douglas, A., Cameron, K. & Hay, A. J. (1996).** Variation of neuraminidase activity of influenza A H3N2 viruses isolated in MDCK cells. *Options for the control of influenza III: Proceedings of the Third International Conference on Options for the Control of Influenza Amsterdam*, 485-490.
- Baum, L. G. & Paulson, J. C. (1990).** Sialyloligosaccharides of the respiratory epithelium in the selection of human influenza virus receptor specificity. *Acta Histochem Suppl* **40**, 35-38.
- Bean, W. J., Schell, M., Katz, J., Kawaoka, Y., Naeve, C., Gorman, O. & Webster, R. G. (1992).** Evolution of the H3 influenza virus hemagglutinin from human and nonhuman hosts. *J Virol* **66**, 1129-1138.
- Beaton, A. R. & Krug, R. M. (1986).** Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**, 6282-6286.
- Biswas, S. K. & Nayak, D. P. (1994).** Mutational analysis of the conserved motifs of influenza A virus polymerase basic protein 1. *J Virol* **68**, 1819-1826.
- Bottcher, E., Matrosovich, T., Beyerle, M., Klenk, H. D., Garten, W. & Matrosovich, M. (2006).** Proteolytic activation of influenza viruses by serine proteases TMPRSS2 and HAT from human airway epithelium. *J Virol* **80**, 9896-9898.
- Bourmakina, S. V. & Garcia-Sastre, A. (2003).** Reverse genetics studies on the filamentous morphology of influenza A virus. *J Gen Virol* **84**, 517-527.
- Burleigh, L. M., Calder, L. J., Skehel, J. J. & Steinhauer, D. A. (2005).** Influenza A viruses with mutations in the m1 helix six domain display a wide variety of morphological phenotypes. *J Virol* **79**, 1262-1270.
- Castrucci, M. R. & Kawaoka, Y. (1993).** Biologic importance of neuraminidase stalk length in influenza A virus. *J Virol* **67**, 759-764.
- Chen, W., Calvo, P. A., Malide, D., Gibbs, J., Schubert, U., Bacik, I., Basta, S., O'Neill, R., Schickli, J., Palese, P., Henklein, P., Bennink, J. R. & Yewdell, J. W. (2001).** A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med* **7**, 1306-1312.
- Chen, Z., Aspelund, A. & Jin, H. (2008).** Stabilizing the glycosylation pattern of influenza B hemagglutinin following adaptation to growth in eggs. *Vaccine* **26**, 361-371.
- Chen, Z., Wang, W., Zhou, H., Suguitan, A. L., Jr., Shambaugh, C., Kim, L., Zhao, J., Kemble, G. & Jin, H. (2010).** Generation of live attenuated novel influenza virus A/California/7/09 (H1N1) vaccines with high yield in embryonated chicken eggs. *J Virol* **84**, 44-51.

Literaturverzeichnis

- CHOPPIN, P. W., MURPHY, J. S. & TAMM, I. (1960).** Studies of two kinds of virus particles which comprise influenza A2 virus strains. III. Morphological characteristics: independence to morphological and functional traits. *J Exp Med* **112**, 945-952.
- Compans, R. W., Content, J. & Duesberg, P. H. (1972).** Structure of the ribonucleoprotein of influenza virus. *J Virol* **10**, 795-800.
- Connor, R. J., Kawaoka, Y., Webster, R. G. & Paulson, J. C. (1994).** Receptor specificity in human, avian, and equine H2 and H3 influenza virus isolates. *Virology* **205**, 17-23.
- Desselberger, U., Racaniello, V. R., Zazra, J. J. & Palese, P. (1980).** The 3' and 5'-terminal sequences of influenza A, B and C virus RNA segments are highly conserved and show partial inverted complementarity. *Gene* **8**, 315-328.
- Dias, A., Bouvier, D., Crepin, T., McCarthy, A. A., Hart, D. J., Baudin, F., Cusack, S. & Ruigrok, R. W. (2009).** The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. *Nature* **458**, 914-918.
- Elleman, C. J. & Barclay, W. S. (2004).** The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. *Virology* **321**, 144-153.
- Feng, J., Zhang, M., Mozdzanowska, K., Zharikova, D., Hoff, H., Wunner, W., Couch, R. B. & Gerhard, W. (2006).** Influenza A virus infection engenders a poor antibody response against the ectodomain of matrix protein 2. *Virol J* **3**, 102.
- Fiers, W., De, F. M., Birkett, A., Neirynck, S. & Min, J. W. (2004).** A "universal" human influenza A vaccine. *Virus Res* **103**, 173-176.
- Fiers, W., De, F. M., El, B. K., Schepens, B., Roose, K., Schotsaert, M., Birkett, A. & Saelens, X. (2009).** M2e-based universal influenza A vaccine. *Vaccine* **27**, 6280-6283.
- Flick, R. & Hobom, G. (1999).** Interaction of influenza virus polymerase with viral RNA in the 'corkscrew' conformation. *J Gen Virol* **80** (Pt 10), 2565-2572.
- Flick, R., Neumann, G., Hoffmann, E., Neumeier, E. & Hobom, G. (1996).** Promoter elements in the influenza vRNA terminal structure. *RNA* **2**, 1046-1057.
- Fodor, E., Mingay, L. J., Crow, M., Deng, T. & Brownlee, G. G. (2003).** A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J Virol* **77**, 5017-5020.
- Fouchier, R. A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelzwaan, G. F., Olsen, B. & Osterhaus, A. D. (2005).** Characterization of a novel influenza A virus hemagglutinin subtype (H16) obtained from black-headed gulls. *J Virol* **79**, 2814-2822.
- Francis, T., Jr. (1934).** TRANSMISSION OF INFLUENZA BY A FILTERABLE VIRUS. *Science* **80**, 457-459.
- Francis, T. & Magill, T. P. (1935).** IMMUNOLOGICAL STUDIES WITH THE VIRUS OF INFLUENZA. *J Exp Med* **62**, 505-516.
- Francis, T. & Magill, T. P. (1936).** THE INCIDENCE OF NEUTRALIZING ANTIBODIES FOR HUMAN INFLUENZA VIRUS IN THE SERUM OF HUMAN INDIVIDUALS OF DIFFERENT AGES. *J Exp Med* **63**, 655-668.
- Frey, S., Vesikari, T., Multanowska, A. & Lattanzi, M. (2009).** Cell-derived influenza vaccine has demonstrable clinical efficacy in healthy adult subjects in the 2007-2008 flue season. Poster at Influenza vaccines for the world, thrid Internationa conference, Cannes.

Literaturverzeichnis

- Gabriel, G., Abram, M., Keiner, B., Wagner, R., Klenk, H. D. & Stech, J. (2007).** Differential polymerase activity in avian and mammalian cells determines host range of influenza virus. *J Virol* **81**, 9601-9604.
- Gabriel, G., Dauber, B., Wolff, T., Planz, O., Klenk, H. D. & Stech, J. (2005).** The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 18590-18595.
- Gagneux, P., Cheriyan, M., Hurtado-Ziola, N., van der Linden, E. C., Anderson, D., McClure, H., Varki, A. & Varki, N. M. (2003).** Human-specific regulation of alpha 2-6-linked sialic acids. *J Biol Chem* **278**, 48245-48250.
- Gambaryan, A. S., Robertson, J. S. & Matrosovich, M. N. (1999).** Effects of egg-adaptation on the receptor-binding properties of human influenza A and B viruses. *Virology* **258**, 232-239.
- Gerdil, C. (2003).** The annual production cycle for influenza vaccine. *Vaccine* **21**, 1776-1779.
- Gomez-Puertas, P., Albo, C., Perez-Pastrana, E., Vivo, A. & Portela, A. (2000).** Influenza virus matrix protein is the major driving force in virus budding. *J Virol* **74**, 11538-11547.
- Gorman, O. T., Bean, W. J., Kawaoka, Y. & Webster, R. G. (1990a).** Evolution of the nucleoprotein gene of influenza A virus. *J Virol* **64**, 1487-1497.
- Gorman, O. T., Donis, R. O., Kawaoka, Y. & Webster, R. G. (1990b).** Evolution of influenza A virus PB2 genes: implications for evolution of the ribonucleoprotein complex and origin of human influenza A virus. *J Virol* **64**, 4893-4902.
- Goto, H. & Kawaoka, Y. (2000).** Assays for functional binding of plasminogen to viral proteins. *Methods* **21**, 159-163.
- Grassauer, A., Egorov, A. Y., Ferko, B., Romanova, I., Katinger, H. & Muster, T. (1998).** A host restriction-based selection system for influenza haemagglutinin transfectant viruses. *J Gen Virol* **79** (Pt 6), 1405-1409.
- Gregersen, J. P. (2008a).** A quantitative risk assessment of exposure to adventitious agents in a cell culture-derived subunit influenza vaccine. *Vaccine* **26**, 3332-3340.
- Gregersen, J. P. (2008b).** A risk-assessment model to rate the occurrence and relevance of adventitious agents in the production of influenza vaccines. *Vaccine* **26**, 3297-3304.
- Guilligay, D., Tarendeau, F., Resa-Infante, P., Coloma, R., Crepin, T., Sehr, P., Lewis, J., Ruigrok, R. W., Ortin, J., Hart, D. J. & Cusack, S. (2008).** The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 500-506.
- Hale, B. G., Knebel, A., Botting, C. H., Galloway, C. S., Precious, B. L., Jackson, D., Elliott, R. M. & Randall, R. E. (2009).** CDK/ERK-mediated phosphorylation of the human influenza A virus NS1 protein at threonine-215. *Virology* **383**, 6-11.
- Hara, K., Schmidt, F. I., Crow, M. & Brownlee, G. G. (2006).** Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. *J Virol* **80**, 7789-7798.
- Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P. & Kawaoka, Y. (2001).** Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. *Science* **293**, 1840-1842.
- Hay, A. J., Lomniczi, B., Bellamy, A. R. & Skehel, J. J. (1977).** Transcription of the influenza virus genome. *Virology* **83**, 337-355.
- Herrler, G., Nagele, A., Meier-Ewert, H., Bhowan, A. S. & Compans, R. W. (1981).** Isolation and structural analysis of influenza C virion glycoproteins. *Virology* **113**, 439-451.

Literaturverzeichnis

- Herrler, G., Rott, R. & Klenk, H. D. (1985).** Neuraminic acid is involved in the binding of influenza C virus to erythrocytes. *Virology* **141**, 144-147.
- Hirst, G. K. (1941).** THE AGGLUTINATION OF RED CELLS BY ALLANTOIC FLUID OF CHICK EMBRYOS INFECTED WITH INFLUENZA VIRUS. *Science* **94**, 22-23.
- Hoffmann, E., Neumann, G., Kawaoka, Y., Hobom, G. & Webster, R. G. (2000).** A DNA transfection system for generation of influenza A virus from eight plasmids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6108-6113.
- Horimoto, T. & Kawaoka, Y. (2009).** Designing vaccines for pandemic influenza. *Curr Top Microbiol Immunol* **333**, 165-176.
- Horimoto, T., Murakami, S., Muramoto, Y., Yamada, S., Fujii, K., Kiso, M., Iwatsuki-Horimoto, K., Kino, Y. & Kawaoka, Y. (2007).** Enhanced growth of seed viruses for H5N1 influenza vaccines. *Virology* **366**, 23-27.
- Hsu, M. T., Parvin, J. D., Gupta, S., Krystal, M. & Palese, P. (1987).** Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 8140-8144.
- Ichinohe, T., Ainal, A., Tashiro, M., Sata, T. & Hasegawa, H. (2009).** PolyI:polyC12U adjuvant-combined intranasal vaccine protects mice against highly pathogenic H5N1 influenza virus variants. *Vaccine* **27**, 6276-6279.
- Ito, T., Gorman, O. T., Kawaoka, Y., Bean, W. J. & Webster, R. G. (1991).** Evolutionary analysis of the influenza A virus M gene with comparison of the M1 and M2 proteins. *J Virol* **65**, 5491-5498.
- Iwatsuki-Horimoto, K., Horimoto, T., Fujii, Y. & Kawaoka, Y. (2004).** Generation of influenza A virus NS2 (NEP) mutants with an altered nuclear export signal sequence. *J Virol* **78**, 10149-10155.
- Katinger, D., Mochalova, L., Chinarev, A., Bovin, N. & Romanova, J. (2004).** Specificity of neuraminidase activity from influenza viruses isolated in different hosts tested with novel substrates. *Arch Virol* **149**, 2131-2140.
- Katz, J. M. & Webster, R. G. (1988).** Antigenic and structural characterization of multiple subpopulations of H3N2 influenza virus from an individual. *Virology* **165**, 446-456.
- Kawaoka, Y., Krauss, S. & Webster, R. G. (1989).** Avian-to-human transmission of the PB1 gene of influenza A viruses in the 1957 and 1968 pandemics. *J Virol* **63**, 4603-4608.
- Kilbourne, E. D. (1969).** Future influenza vaccines and the use of genetic recombinants. *Bull World Health Organ* **41**, 643-645.
- Klenk, H. D., Rott, R., Orlich, M. & Blodorn, J. (1975).** Activation of influenza A viruses by trypsin treatment. *Virology* **68**, 426-439.
- Kumari, K., Gulati, S., Smith, D. F., Gulati, U., Cummings, R. D. & Air, G. M. (2007).** Receptor binding specificity of recent human H3N2 influenza viruses. *Virol J* **4**, 42.
- Lamb, R. A. & Takeda, M. (2001).** Death by influenza virus protein. *Nat Med* **7**, 1286-1288.
- Li, X. & Palese, P. (1992).** Mutational analysis of the promoter required for influenza virus virion RNA synthesis. *J Virol* **66**, 4331-4338.
- Li, X. & Palese, P. (1994).** Characterization of the polyadenylation signal of influenza virus RNA. *J Virol* **68**, 1245-1249.

Literaturverzeichnis

- Lu, B., Zhou, H., Ye, D., Kemble, G. & Jin, H. (2005).**Improvement of influenza A/Fujian/411/02 (H3N2) virus growth in embryonated chicken eggs by balancing the hemagglutinin and neuraminidase activities, using reverse genetics. *J Virol* **79**, 6763-6771.
- Ludwig, S. (2009).**Targeting cell signalling pathways to fight the flu: towards a paradigm change in anti-influenza therapy. *J Antimicrob Chemother* **64**, 1-4.
- Ludwig, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Wurzer, W. J., Reinhardt, J., Planz, O. & Pleschka, S. (2004).**MEK inhibition impairs influenza B virus propagation without emergence of resistant variants. *FEBS Lett* **561**, 37-43.
- Luo, G. X., Luytjes, W., Enami, M. & Palese, P. (1991).**The polyadenylation signal of influenza virus RNA involves a stretch of uridines followed by the RNA duplex of the panhandle structure. *J Virol* **65**, 2861-2867.
- Marcus, P. I., Ngunjiri, J. M. & Sekellick, M. J. (2009).**Dynamics of biologically active subpopulations of influenza virus: plaque-forming, noninfectious cell-killing, and defective interfering particles. *J Virol* **83**, 8122-8130.
- Marjuki, H., Alam, M. I., Ehrhardt, C., Wagner, R., Planz, O., Klenk, H. D., Ludwig, S. & Pleschka, S. (2006).**Membrane accumulation of influenza A virus hemagglutinin triggers nuclear export of the viral genome via protein kinase Calpha-mediated activation of ERK signaling. *J Biol Chem* **281**, 16707-16715.
- Martin, K. & Helenius, A. (1991).**Nuclear transport of influenza virus ribonucleoproteins: the viral matrix protein (M1) promotes export and inhibits import. *Cell* **67**, 117-130.
- Matrosovich, M. N., Gambaryan, A. S., Teneberg, S., Piskarev, V. E., Yamnikova, S. S., Lvov, D. K., Robertson, J. S. & Karlsson, K. A. (1997).**Avian influenza A viruses differ from human viruses by recognition of sialyloligosaccharides and gangliosides and by a higher conservation of the HA receptor-binding site. *Virology* **233**, 224-234.
- Matrosovich, M. N., Matrosovich, T. Y., Gray, T., Roberts, N. A. & Klenk, H. D. (2004).**Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4620-4624.
- Meguro, H., Bryant, J. D., Torrence, A. E. & Wright, P. F. (1979).**Canine kidney cell line for isolation of respiratory viruses. *J Clin Microbiol* **9**, 175-179.
- Meyer, W. J., Wood, J. M., Major, D., Robertson, J. S., Webster, R. G. & Katz, J. M. (1993).**Influence of host cell-mediated variation on the international surveillance of influenza A (H3N2) viruses. *Virology* **196**, 130-137.
- Mitnaul, L. J., Matrosovich, M. N., Castrucci, M. R., Tuzikov, A. B., Bovin, N. V., Kobasa, D. & Kawaoka, Y. (2000).**Balanced hemagglutinin and neuraminidase activities are critical for efficient replication of influenza A virus. *J Virol* **74**, 6015-6020.
- Mizumura, K., Hashimoto, S., Maruoka, S., Gon, Y., Kitamura, N., Matsumoto, K., Hayashi, S., Shimizu, K. & Horie, T. (2003).**Role of mitogen-activated protein kinases in influenza virus induction of prostaglandin E2 from arachidonic acid in bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy* **33**, 1244-1251.
- Modrow, S., Falke, D. & Truyen, U. (2003).**Orthomyxoviren. In *Molekulare Virologie*, 2 edn, pp. 317-342: Spektrum.
- Murakami, S., Horimoto, T., Mai, I. Q., Nidom, C. A., Chen, H., Muramoto, Y., Yamada, S., Iwasa, A., Iwatsuki-Horimoto, K., Shimojima, M., Iwata, A. & Kawaoka, Y. (2008).**Growth determinants for H5N1 influenza vaccine seed viruses in MDCK cells. *J Virol* **82**, 10502-10509.

Literaturverzeichnis

- Neumann, G., Castrucci, M. R. & Kawaoka, Y. (1997).** Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol* **71**, 9690-9700.
- Neumann, G., Noda, T. & Kawaoka, Y. (2009).** Emergence and pandemic potential of swine-origin H1N1 influenza virus. *Nature* **459**, 931-939.
- Nobusawa, E. & Sato, K. (2006).** Comparison of the mutation rates of human influenza A and B viruses. *J Virol* **80**, 3675-3678.
- Novartis Pharma Schweiz AG (2007).** MF59 – der Wirkverstärker für Grippeimpfstoffe. *Health & Science*, 12-13.
- O'Neill, R. E., Talon, J. & Palese, P. (1998).** The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J* **17**, 288-296.
- Odagiri, T. & Tobita, K. (1990).** Mutation in NS2, a nonstructural protein of influenza A virus, extragenically causes aberrant replication and expression of the PA gene and leads to generation of defective interfering particles. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 5988-5992.
- Ohuchi, M., Ohuchi, R., Feldmann, A. & Klenk, H. D. (1997).** Regulation of receptor binding affinity of influenza virus hemagglutinin by its carbohydrate moiety. *J Virol* **71**, 8377-8384.
- Ortega, J., Martin-Benito, J., Zurcher, T., Valpuesta, J. M., Carrascosa, J. L. & Ortin, J. (2000).** Ultrastructural and functional analyses of recombinant influenza virus ribonucleoproteins suggest dimerization of nucleoprotein during virus amplification. *J Virol* **74**, 156-163.
- Parvin, J. D., Palese, P., Honda, A., Ishihama, A. & Krystal, M. (1989).** Promoter analysis of influenza virus RNA polymerase. *J Virol* **63**, 5142-5152.
- Pinto, L. H., Holsinger, L. J. & Lamb, R. A. (1992).** Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell* **69**, 517-528.
- Pinto, L. H. & Lamb, R. A. (2006).** The M2 proton channels of influenza A and B viruses. *J Biol Chem* **281**, 8997-9000.
- Pleschka, S. (2008).** RNA viruses and the mitogenic Raf/MEK/ERK signal transduction cascade. *Biol Chem* **389**, 1273-1282.
- Pleschka, S., Wolff, T., Ehrhardt, C., Hobom, G., Planz, O., Rapp, U. R. & Ludwig, S. (2001).** Influenza virus propagation is impaired by inhibition of the Raf/MEK/ERK signalling cascade. *Nat Cell Biol* **3**, 301-305.
- Ponimaskin, E. & Schmidt, M. F. (1998).** Domain-structure of cytoplasmic border region is main determinant for palmitoylation of influenza virus hemagglutinin (H7). *Virology* **249**, 325-335.
- Poon, L. L., Pritlove, D. C., Sharps, J. & Brownlee, G. G. (1998).** The RNA polymerase of influenza virus, bound to the 5' end of virion RNA, acts in cis to polyadenylate mRNA. *J Virol* **72**, 8214-8219.
- Portela, A. & Digard, P. (2002).** The influenza virus nucleoprotein: a multifunctional RNA-binding protein pivotal to virus replication. *J Gen Virol* **83**, 723-734.
- Regan, J. F., Liang, Y. & Parslow, T. G. (2006).** Defective assembly of influenza A virus due to a mutation in the polymerase subunit PA. *J Virol* **80**, 252-261.
- Robb, N. C., Smith, M., Vreede, F. T. & Fodor, E. (2009).** NS2/NEP protein regulates transcription and replication of the influenza virus RNA genome. *J Gen Virol* **90**, 1398-1407.

Literaturverzeichnis

- Rogers, G. N. & Paulson, J. C. (1983).** Receptor determinants of human and animal influenza virus isolates: differences in receptor specificity of the H3 hemagglutinin based on species of origin. *Virology* **127**, 361-373.
- Rogers, G. N., Paulson, J. C., Daniels, R. S., Skehel, J. J., Wilson, I. A. & Wiley, D. C. (1983).** Single amino acid substitutions in influenza haemagglutinin change receptor binding specificity. *Nature* **304**, 76-78.
- Rohm, C., Zhou, N., Suss, J., Mackenzie, J. & Webster, R. G. (1996).** Characterization of a novel influenza hemagglutinin, H15: criteria for determination of influenza A subtypes. *Virology* **217**, 508-516.
- Romanova, J., Katinger, D., Ferko, B., Voglauer, R., Mochalova, L., Bovin, N., Lim, W., Katinger, H. & Egorov, A. (2003).** Distinct host range of influenza H3N2 virus isolates in Vero and MDCK cells is determined by cell specific glycosylation pattern. *Virology* **307**, 90-97.
- Safdar, A. & Cox, M. M. (2007).** Baculovirus-expressed influenza vaccine. A novel technology for safe and expeditious vaccine production for human use. *Expert Opin Investig Drugs* **16**, 927-934.
- Salomon, R., Franks, J., Govorkova, E. A., Ilyushina, N. A., Yen, H. L., Hulse-Post, D. J., Humberd, J., Trichet, M., Reh, J. E., Webby, R. J., Webster, R. G. & Hoffmann, E. (2006).** The polymerase complex genes contribute to the high virulence of the human H5N1 influenza virus isolate A/Vietnam/1203/04. *J Exp Med* **203**, 689-697.
- Scheiffele, P., Rietveld, A., Wilk, T. & Simons, K. (1999).** Influenza viruses select ordered lipid domains during budding from the plasma membrane. *J Biol Chem* **274**, 2038-2044.
- Schmitt, H. J., Gregersen, J. P., Trusheim, H. & Broecker, M. (2010).** Sicherheit von Influenza-Impfstoffen auf Zellkulturbasis. *Medizinische Monatsschrift für Pharmazeuten* **33**, 4-10.
- Schnitzler, S. U. & Schnitzler, P. (2009).** An update on swine-origin influenza virus A/H1N1: a review. *Virus Genes*.
- Scholtissek, C., Ludwig, S. & Fitch, W. M. (1993).** Analysis of influenza A virus nucleoproteins for the assessment of molecular genetic mechanisms leading to new phylogenetic virus lineages. *Arch Virol* **131**, 237-250.
- Schroeder, C., Heider, H., Moncke-Buchner, E. & Lin, T. I. (2005).** The influenza virus ion channel and maturation cofactor M2 is a cholesterol-binding protein. *Eur Biophys J* **34**, 52-66.
- Schwarzer, J., Rapp, E., Hennig, R., Genzel, Y., Jordan, I., Sandig, V. & Reichl, U. (2009).** Glycan analysis in cell culture-based influenza vaccine production: influence of host cell line and virus strain on the glycosylation pattern of viral hemagglutinin. *Vaccine* **27**, 4325-4336.
- Shi, L., Summers, D. F., Peng, Q. & Galarz, J. M. (1995).** Influenza A virus RNA polymerase subunit PB2 is the endonuclease which cleaves host cell mRNA and functions only as the trimeric enzyme. *Virology* **208**, 38-47.
- Shu, L. L., Bean, W. J. & Webster, R. G. (1993).** Analysis of the evolution and variation of the human influenza A virus nucleoprotein gene from 1933 to 1990. *J Virol* **67**, 2723-2729.
- Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (2000).** Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem* **69**, 531-569.
- Snyder, M. H., Buckler-White, A. J., London, W. T., Tierney, E. L. & Murphy, B. R. (1987).** The avian influenza virus nucleoprotein gene and a specific constellation of avian and human virus polymerase genes each specify attenuation of avian-human influenza A/Pintail/79 reassortant viruses for monkeys. *J Virol* **61**, 2857-2863.
- Stanley, W. M. (1944).** AN EVALUATION OF METHODS FOR THE CONCENTRATION AND PURIFICATION OF INFLUENZA VIRUS. *J Exp Med* **79**, 255-266.

Literaturverzeichnis

- Stieneke-Grober, A., Vey, M., Angliker, H., Shaw, E., Thomas, G., Roberts, C., Klenk, H. D. & Garten, W. (1992).** Influenza virus hemagglutinin with multibasic cleavage site is activated by furin, a subtilisin-like endoprotease. *EMBO J* **11**, 2407-2414.
- Stohr, K. (2003).** The global agenda on influenza surveillance and control. *Vaccine* **21**, 1744-1748.
- Subbarao, K., Klimov, A., Katz, J., Regnery, H., Lim, W., Hall, H., Perdue, M., Swayne, D., Bender, C., Huang, J., Hemphill, M., Rowe, T., Shaw, M., Xu, X., Fukuda, K. & Cox, N. (1998).** Characterization of an avian influenza A (H5N1) virus isolated from a child with a fatal respiratory illness. *Science* **279**, 393-396.
- Sugrue, R. J. & Hay, A. J. (1991).** Structural characteristics of the M2 protein of influenza A viruses: evidence that it forms a tetrameric channel. *Virology* **180**, 617-624.
- Suphaphiphat, P., Keiner, B., Trusheim, H., Crotta, S., Tuccino, A. B., Zhang, P., Dormitzer, P. R., Mason, P. W. & Franti, M. (2010).** Human RNA Polymerase I-Driven Reverse Genetics for Influenza A Virus in Canine Cells. *J Virol*.
- Tashiro, M., Ciborowski, P., Reinacher, M., Pulverer, G., Klenk, H. D. & Rott, R. (1987).** Synergistic role of staphylococcal proteases in the induction of influenza virus pathogenicity. *Virology* **157**, 421-430.
- Taubenberger, J. K. & Morens, D. M. (2006).** 1918 Influenza: the mother of all pandemics. *Emerg Infect Dis* **12**, 15-22.
- Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Krafft, A. E., Bijwaard, K. E. & Fanning, T. G. (1997).** Initial genetic characterization of the 1918 "Spanish" influenza virus. *Science* **275**, 1793-1796.
- Taubenberger, J. K., Reid, A. H., Lourens, R. M., Wang, R., Jin, G. & Fanning, T. G. (2005).** Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature* **437**, 889-893.
- Treanor, J. J., Betts, R. F., Smith, G. E., Anderson, E. L., Hackett, C. S., Wilkinson, B. E., Belshe, R. B. & Powers, D. C. (1996).** Evaluation of a recombinant hemagglutinin expressed in insect cells as an influenza vaccine in young and elderly adults. *J Infect Dis* **173**, 1467-1470.
- Treanor, J. J., Schiff, G. M., Hayden, F. G., Brady, R. C., Hay, C. M., Meyer, A. L., Holden-Wiltse, J., Liang, H., Gilbert, A. & Cox, M. (2007).** Safety and immunogenicity of a baculovirus-expressed hemagglutinin influenza vaccine: a randomized controlled trial. *JAMA* **297**, 1577-1582.
- Trusheim H., Roth B., Wilms R., Jung S., Muth R., Eggers M., Elsen M., Lenz-Bauer C., Schwarz K., Schneider S., Kreibich S., Dittmar L., Veit E., Schaar T. (2007).** The MDCK 33016-PF cell line is not only suitable for the production of cell-based Influenza vaccine but is also an ideal substrate for Influenza virus isolation. *Options for the Control of Influenza VI, Toronto, Kanada*
- Ulmanen, I., Broni, B. A. & Krug, R. M. (1981).** Role of two of the influenza virus core P proteins in recognizing cap 1 structures (m7GpppNm) on RNAs and in initiating viral RNA transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **78**, 7355-7359.
- Ulmer, J. B., Valley, U. & Rappuoli, R. (2006).** Vaccine manufacturing: challenges and solutions. *Nat Biotechnol* **24**, 1377-1383.
- Voeten, J. T., Brands, R., Palache, A. M., van Scharrenburg, G. J., Rimmelzwaan, G. F., Osterhaus, A. D. & Claas, E. C. (1999).** Characterization of high-growth reassortant influenza A viruses generated in MDCK cells cultured in serum-free medium. *Vaccine* **17**, 1942-1950.
- Wagner, R., Matrosovich, M. & Klenk, H. D. (2002).** Functional balance between haemagglutinin and neuraminidase in influenza virus infections. *Rev Med Virol* **12**, 159-166.

Literaturverzeichnis

- Wagner, R., Wolff, T., Herwig, A., Pleschka, S. & Klenk, H. D. (2000).**Interdependence of hemagglutinin glycosylation and neuraminidase as regulators of influenza virus growth: a study by reverse genetics. *J Virol* **74**, 6316-6323.
- Wang, C. C., Chen, J. R., Tseng, Y. C., Hsu, C. H., Hung, Y. F., Chen, S. W., Chen, C. M., Khoo, K. H., Cheng, T. J., Cheng, Y. S., Jan, J. T., Wu, C. Y., Ma, C. & Wong, C. H. (2009).**Glycans on influenza hemagglutinin affect receptor binding and immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 18137-18142.
- Wang, P., Palese, P. & O'Neill, R. E. (1997).**The NPI-1/NPI-3 (karyopherin alpha) binding site on the influenza A virus nucleoprotein NP is a nonconventional nuclear localization signal. *J Virol* **71**, 1850-1856.
- Wanitchang, A., Kramyu, J. & Jongkaewwattana, A. (2010).**Enhancement of reverse genetics-derived swine-origin H1N1 influenza virus seed vaccine growth by inclusion of indigenous polymerase PB1 protein. *Virus Res* **147**, 145-148.
- Webster, R. G., Bean, W. J., Gorman, O. T., Chambers, T. M. & Kawaoka, Y. (1992).**Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiol Rev* **56**, 152-179.
- Weis, W., Brown, J. H., Cusack, S., Paulson, J. C., Skehel, J. J. & Wiley, D. C. (1988).**Structure of the influenza virus haemagglutinin complexed with its receptor, sialic acid. *Nature* **333**, 426-431.
- Wessling, M. (2009).**Adjuvantien in Grippeimpfstoffen – MF59. *ImpfDialog* **2**, 44-46.
- Whittaker, G., Bui, M. & Helenius, A. (1996).**Nuclear trafficking of influenza virus ribonucleoproteins in heterokaryons. *J Virol* **70**, 2743-2756.
- WHO (2005).**WHO Position Paper. *Weekly epidemiological record* **80**, 279-287.
- Widjaja, L., Ilyushina, N., Webster, R. G. & Webby, R. J. (2006).**Molecular changes associated with adaptation of human influenza A virus in embryonated chicken eggs. *Virology* **350**, 137-145.
- Williams, S. P. & Robertson, J. S. (1993).**Analysis of the restriction to the growth of nonegg-adapted human influenza virus in eggs. *Virology* **196**, 660-665.
- Xing, Z., Cardona, C. J., Anunciacion, J., Adams, S. & Dao, N. (2010).**Roles of the ERK MAPK in the regulation of proinflammatory and apoptotic responses in chicken macrophages infected with H9N2 avian influenza virus. *J Gen Virol* **91**, 343-351.
- Xu, X., Zhu, X., Dwek, R. A., Stevens, J. & Wilson, I. A. (2008).**Structural characterization of the 1918 influenza virus H1N1 neuraminidase. *J Virol* **82**, 10493-10501.
- Yasuda, J., Nakada, S., Kato, A., Toyoda, T. & Ishihama, A. (1993).**Molecular assembly of influenza virus: association of the NS2 protein with virion matrix. *Virology* **196**, 249-255.
- Ye, Q., Krug, R. M. & Tao, Y. J. (2006).**The mechanism by which influenza A virus nucleoprotein forms oligomers and binds RNA. *Nature* **444**, 1078-1082.
- Yuan, P., Bartlam, M., Lou, Z., Chen, S., Zhou, J., He, X., Lv, Z., Ge, R., Li, X., Deng, T., Fodor, E., Rao, Z. & Liu, Y. (2009).**Crystal structure of an avian influenza polymerase PA(N) reveals an endonuclease active site. *Nature* **458**, 909-913.
- Zamarin, D., Garcia-Sastre, A., Xiao, X., Wang, R. & Palese, P. (2005).**Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. *PLoS Pathog* **1**, e4.
- Zamarin, D., Ortigoza, M. B. & Palese, P. (2006).**Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. *J Virol* **80**, 7976-7983.

Literaturverzeichnis

- Zell, R., Krumbholz, A., Eitner, A., Krieg, R., Halbhuber, K. J. & Wutzler, P. (2007).**Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. *J Gen Virol* **88**, 536-546.
- Zhirnov, O. P. & Klenk, H. D. (2007).**Control of apoptosis in influenza virus-infected cells by up-regulation of Akt and p53 signaling. *Apoptosis* **12**, 1419-1432.
- Zhirnov, O. P., Konakova, T. E., Wolff, T. & Klenk, H. D. (2002).**NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J Virol* **76**, 1617-1625.
- Zhirnov, O. P., Vorobjeva, I. V., Saphonova, O. A., Malyshev, N. A., Ovcharenko, A. V. & Klenk, H. D. (2007).**Specific biochemical features of replication of clinical influenza viruses in human intestinal cell culture. *Biochemistry (Mosc)* **72**, 398-408.
- Zhirnov, O. P., Vorobjeva, I. V., Saphonova, O. A., Poyarkov, S. V., Ovcharenko, A. V., Anhlan, D. & Malyshev, N. A. (2009).**Structural and evolutionary characteristics of HA, NA, NS and M genes of clinical influenza A/H3N2 viruses passaged in human and canine cells. *J Clin Virol* **45**, 322-333.
- Zimmer, S. M. & Burke, D. S. (2009).**Historical perspective--Emergence of influenza A (H1N1) viruses. *N Engl J Med* **361**, 279-285.

Anhang

A Anhang

A.1 Sequenzdaten des HA der ei- und zellgewachsenen Viren

H1N1 Viren

```
21 71 101
NB # 080 Ausgang HA CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL ENSHNGKLCL -- NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP -- NPENGT CYPG QFADYEELRE
NB # 080 Zelle HA CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL ENSHNGKLCL -- NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP -- NPENGT CYPG QFADYEELRE
NB # 080 Ei HA CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL ENSHNGKLCL -- NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP -- NPENGT CYPG QFADYEELRE

NB # 324 Ausgang HA CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL EDSHNGKLCL -- NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP -- NPENGT CYPG HFADYEELRE
NB # 324 Zelle HA CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL EDSHNGKLCL -- NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP -- NPENGT CYPG HFADYEELRE
NB # 324 Ei HA CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL EDSHNGKLCL -- NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEKP -- NPENGT CYPG HFADYEELRE

141 161 201 251 301 491
NB # 080 Ausgang HA FNHTVTGVSA -- YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL -- IGQKALYHT -- EPGDTIIFEA - AINSSLFPQN -- CMESVKNGTY --
NB # 080 Zelle HA FNHTVTGVSA -- YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL -- IGQKALYHT -- EPGDTIIFEA - AINSSLFPQN -- CMESVKNGTY --
NB # 080 Ei HA FNHTVTGVSA -- YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL -- IGQKALYHT -- EPGDTIIFEA - AINSSLFPQN -- CMESVKNGTY --

NB # 324 Ausgang HA FNHTVTGVSA -- YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL -- IGQKALYHT -- GPGDTIIFEA - AINSSLFPQN -- CMESVKNGTY --
NB # 324 Zelle HA FNHTVTGVSA -- YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL -- IGQKALYHT -- GPGDTIIFEA - AINSSLFPQN -- CMESVKNGTY --
NB # 324 Ei HA FNHTVTGVSA -- YRNLLWLTGK NGLYPNLSKS YANNKEKEVL -- IGQKALYHT -- GPGDTIIFEA - AINSSLFPQN -- CMESVKNGTY --

541
NB # 080 Ausgang HA VLLVSLGAIG FWMCSNGSLQ
NB # 080 Zelle HA VLLVSLGAIG FWMCSNGSLQ
NB # 080 Ei HA VLLVSLGAIG FWMCSNGSLQ

NB # 324 Ausgang HA VLLVSLGAIS FWMCSNGSLQ
NB # 324 Zelle HA VLLVSLGAIS FWMCSNGSLQ
NB # 324 Ei HA VLLVSLGAIS FWMCSNGSLQ
```

H3N2 Viren

```
21 41 121
NB # 009 Ausgang HA GNDNSTATLC LGHHA VNGT -- EVTNATELVQ SSSTGGICDS PHQILDGNC TLIDALLGDP -- YTSRSLVAS SGTLEFPNE FNV GVTQNG TSSACKRGSD
NB # 009 Zelle HA GNDNSTATLC LGHHA VNGT -- EVTNATELVQ SSSTGGICDS PHQILDGNC TLIDALLGDP -- YTSRSLVAS SGTLEFPNE FNV GVTQNG TSSACKRGSD
NB # 009 Ei HA GNDNSTATLC LGHHA VNGT -- EVTNATELVQ SSSTGGICDS PHQILDGNC TLIDALLGDP -- YTSRSLVAS SGTLEFPNE FNV GVTQNG TSSACKRGSD

NB # 084 Ausgang HA GNDNSTATLC LGHHA VNGT -- EVTNATELVQ SSSTGGICDS PHQILDGNC TLIDALLGDP -- YASRSLVAS SGTLEFPNE FNV GVTQNG TSSACIRRS
NB # 084 Zelle HA GNDNSTATLC LGHHA VNGT -- EVTNATELVQ SSSTGGICDS PHQILDGNC TLIDALLGDP -- YASRSLVAS SGTLEFPNE FNV GVTQNG TSSACIRRS
NB # 084 Ei HA GNDNSTATLC LGHHA VNGT -- EVTNATELVQ SSSTGGICDS PHQILDGNC TLIDALLGDP -- YASRSLVAS SGTLEFPNE FNV GVTQNG TSSACIRRS

NB # 260 Ausgang HA GIDNSTATLC LGHHA VNGT -- EVTNATELVQ SSSTGGICDS PHQILDGNC TLIDALLGDP -- YASRSLVAS SGTLEFPNEN FNV GVTQNG TSSACKRGS
NB # 260 Zelle HA GIDNSTATLC LGHHA VNGT -- EVTNATELVQ SSSTGGICDS PHQILDGNC TLIDALLGDP -- YASRSLVAS SGTLEFPNEN FNV GVTQNG TSSACKRGS
NB # 260 Ei HA GIDNSTATLC LGHHA VNGT -- EVTNATELVQ SSSTGGICDS PHQILDGNC TLIDALLGDP -- YASRSLVAS SGTLEFPNEN FNV GVTQNG TSSACKRGS

NB # 377 Ausgang HA GNDNSTATLC LGHHA VNGT -- EVTNATELVQ SSSTGGICDS PHQILDGNC TLIDALLGDP -- YASRSLVAS SGTLEFPNE FNV GVTQNG TSSACIRRS
NB # 377 Zelle HA GNDNSTATLC LGHHA VNGT -- EVTNATELVQ SSSTGGICDS PHQILDGNC TLIDALLGDP -- YASRSLVAS SGTLEFPNE FNV GVTQNG TSSACIRRS
NB # 377 Ei HA GNDNSTATLC LGHHA VNGT -- EVTNATELVQ SSSTGGICDS PHQILDGNC TLIDALLGDP -- YASRSLVAS SGTLEFPNE FNV GVTQNG TSSACIRRS

161 181 161 301 331 391
NB # 009 Ausgang HA NSFFSRLNWL -- NVTMPNNEKF DKLYIWGVHH PGTDNDQIFL -- INSTGNLIAP -- NGSIPNDKPF -- KLATGMRNVL -- NQINGKLNRL
NB # 009 Zelle HA NSFFSRLNWL -- NVTMPNNEKF DKLYIWGVHH PGTDNDQIFL -- INSTGNLIAP -- NGSIPNDKPF -- KLATGMRNVL -- NQINGKLNRL
NB # 009 Ei HA NSFFSRLNWL -- NVTMPNNEKF DKLYIWGVHH PGTDNDQIFL -- INSTGNLIAP -- NGSIPNDKPF -- KLATGMRNVL -- NQINGKLNRL

NB # 084 Ausgang HA NSFFSRLNWL -- NVTMPNNEKF DKLYIWGVHH PGTDNDQIFL -- INSTGNLIAP -- NGSIPNDKPF -- KLATGMRNVP -- DQINGKLNRL
NB # 084 Zelle HA NSFFSRLNWL -- NVTMPNNEKF DKLYIWGVHH PGTDNDQIFL -- INSTGNLIAP -- NGSIPNDKPF -- KLATGMRNVP -- DQINGKLNRL
NB # 084 Ei HA NSFFSRLNWL -- NVTMPNNEKF DKLYIWGVHH PGTDNDQIFL -- INSTGNLIAP -- NGSIPNDKPF -- KLATGMRNVP -- DQINGKLNRL

NB # 260 Ausgang HA NSFFSRLNWL -- NVTMPNNEEF DKLYIWGVHH PGTDNDQIFL -- INSTGNLIAP -- NGSIPNDKPF -- KLATGMRNVP -- DQINGKLNRL
NB # 260 Zelle HA NSFFSRLNWL -- NVTMPNNEEF DKLYIWGVHH PGTDNDQIFL -- INSTGNLIAP -- NGSIPNDKPF -- KLATGMRNVP -- DQINGKLNRL
NB # 260 Ei HA NSFFSRLNWL -- NVTMPNNEEF DKLYIWGVHH PGTDNDQIFL -- INSTGNLIAP -- NGSIPNDKPF -- KLATGMRNVP -- DQINGKLNRL

NB # 377 Ausgang HA NSFFSRLNWL -- NVTMPNNEKF DKLYIWGVHH PGTDNDQIFL -- INSTGNLIAP -- NGSIPNDKPF -- KLATGMRNVP -- DQINGKLNRL
NB # 377 Zelle HA NSFFSRLNWL -- NVTMPNNEKF DKLYIWGVHH PGTDNDQIFL -- INSTGNLIAP -- NGSIPNDKPF -- KLATGMRNVP -- DQINGKLNRL
NB # 377 Ei HA NSFFSRLNWL -- NVTMPNNEKF DKLYIWGVHH PGTDNDQIFL -- INSTGNLIAP -- NGSIPNDKPF -- KLATGMRNVP -- DQINGKLNRL

461 491 531 561
NB # 009 Ausgang HA NKLFERTKKQ -- NACIGSIRNG TYDHDVYRDE -- ILWISFAMSC -- RCNICI
NB # 009 Zelle HA NKLFERTKKQ -- NACIGSIRNG TYDHDVYRDE -- ILWISFAMSC -- RCNICI
NB # 009 Ei HA NKLFERTKKQ -- NACIGSIRNG TYDHDVYRDE -- ILWISFAMSC -- RCNICI

NB # 084 Ausgang HA NKLFERTKKQ -- NACIGSIRNG TYDHDVYRDE -- ILWISFAISC -- RCNICI
NB # 084 Zelle HA NKLFERTKKQ -- NACIGSIRNG TYDHDVYRDE -- ILWISFAISC -- RCNICI
NB # 084 Ei HA NKLFERTKKQ -- NACIGSIRNG TYDHDVYRDE -- ILWISFAISC -- RCNICI

NB # 260 Ausgang HA NKLFERTKKQ -- NACIGSIRNG TYDHDVYRDE -- ILWISFAISC -- RCNICI
NB # 260 Zelle HA NKLFERTKKQ -- NACIGSIRNG TYDHDVYRDE -- ILWISFAISC -- RCNICI
NB # 260 Ei HA NKLFERTKKQ -- NACIGSIRNG TYDHDVYRDE -- ILWISFAISC -- RCNICI

NB # 377 Ausgang HA NKLFERTKKQ -- NACIGSIRNG TYDHDVYRDE -- ILWISFAISC -- RCNICI
NB # 377 Zelle HA NKLFERTKKQ -- NACIGSIRNG TYDHDVYRDE -- ILWISFAISC -- RCNICI
NB # 377 Ei HA NKLFERTKKQ -- NACIGSIRNG TYDHDVYRDE -- ILWISFAISC -- RCNICI
```

Anhang

B Viren

	31	71	151	181	211	241	341
NB # 215 Ausgang HA	VKTATQGEVN VTGVIPLTTT	-- KCLNCTDLDV --	KIGTSGSCP N VTNGNGFFAT --	NKTATNSLTI --	DNETQMAKLY --	SQIGGFPNQT --	KTPLKLANGT
NB # 215 Zelle HA	VKTATQGEVN VTGVIPLTTT	-- KCLNCTDLDV --	KIGTSGSCP N VTNGNGFFAT --	NKTATNSLTI --	DNETQMAKLY --	SQIGGFPNQT --	KTPLKLANGT
NB # 215 Ei HA	VKTATQGEVN VTGVIPLTTT	-- KCLNCTDLDV --	KIGTSGSCP N VTNGNGFFAT --	NKTATNSLTI --	DNETQMAKLY --	SQIGGFPNQT --	KTPLKLANGT
	501	531					
NB # 215 Ausgang HA	ETKHKCNQT C --	SLNITTAASLN	DDGLDNHTIM				
NB # 215 Zelle HA	ETKHKCNQT C --	SLNITTAASLN	DDGLDNHTIM				
NB # 215 Ei HA	ETKHKCNQT C --	SLNITTAASLN	DDGLDNHTIM				

Sequenzen der Viren, welche fünf Passagen entweder in Eiern oder auf der MDCK33016 PF Zelle gewachsen sind, verglichen mit den Ausgangsviren. **Rot** sind die gefundenen Mutationen, **Gelb** zeigt die potentiellen Glykosylierungsstellen. **Blau** und **Grün** zeigen Unterschiede der einzelnen Isolate. Sequenzen, welche identisch sind wurden nicht gezeigt.

A.2 Sequenzvergleich von NB # 105, PR8 NYMC, PR8 RKI (HA und NA)

	1
HA NB # 105	MKVLLVLLC TFTAADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL EDSHNGKLC LKGIAPLQLG NCSVAGWILG NPECELLISK ESWSYIVEIP
HA PR8 NYMC	MKANLLVLLC ALAADADTI CIGYHTNNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL EDSHNGKLCR LKGIAPLQLG KCNTAGWLLG NPECDPLLPV RSWSYIVETP
HA PR8 RKI	MKANLLVLLC ALAADADTI CIGYHANNST DTVDTVLEKN VTVTHSVNLL EDSHNGKLCR LKGIAPLQLG KCNTAGWLLG NPECDPLLPV RSWSYIVETP
	101
HA NB # 105	NPENGCYPG YFADYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNH-TVTGVS ASCSHCKSS FYRNLWLWG KNGLYPMLSK SYANNKEKEV LVLWGIVHHP
HA PR8 NYMC	NSENGICYPG DFIDYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNH-NTNGVT AACSHCKSS FYRNLWLTE KEGSYPKLN SYVNKKGKEV LVLWGIHHP
HA PR8 RKI	NSENGICYPG DFIDYEELRE QLSSVSSFER FEIFPKESSW PNHNTNRGVT AACSHCKSS FYRNLWLTE KEGSYPKLN SYVNKKGKEV LVLWGIHHP
	201
HA NB # 105	NIGDQRALYH TENAYVSVVS SHYSRRFTPE IAKRPKVRQG EGRINYYWTL LEPGDTIIFE ANGNLIAPRF AFALSRGLGS GIITSNAPMD ECDACKCQTQ
HA PR8 NYMC	NSKEQQLNYQ NENAYVSVVT SNYNRRFTPE IAERPVRDQ AGRMNYWTL LKPGDTIIFE ANGNLIAPMY AFALSRGFGS GIITSNASHH ECNTKQCOTPL
HA PR8 RKI	NSKEQQLNYQ NENAYVSVVT SNYNRRFTPE IAERPVRDQ AGRMNYWTL LKPGDT-IIE ANGNLIAPMY AFALSRGFGS GIITSNASHH ECNTKQCOTPL
	301
HA NB # 105	GAINSSLPFQ NVHPVTIGEC PKYVRSAKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI AGFIEGGWTG MVDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI
HA PR8 NYMC	GAINSSLPYQ NIHPVTIGEC PKYVRSAKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI AGFIEGGWTG MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNTVI
HA PR8 RKI	GAINSSLPYQ NIHPVTIGEC PKYVRSAKLR MVTGLRNIPS IQSRGLFGAI AGFIEGGWTG MIDGWYGYHH QNEQSGGYAA DQKSTQNAIN GITNKVNSVI
	401
HA NB # 105	EKMNTQFTAV GKEFNKLERR MENLNKKVDD GFLDIWYNA ELLVLENER TLDPHDSNVK NLYEKVKSQ LKNAKEIGNG CFEFYHKCND ECMESVNGT
HA PR8 NYMC	EKMNTQFTAV GKEFNKLEKR MENLNKKVDD GFLDIWYNA ELLVLENER TLEPHDSNVK NLYEKVKSQ LKNAKEIGNG CFEFYHKCDN ECMESVNGT
HA PR8 RKI	EKMNTQFTAV GKEFNKLEKR MENLNKKVDD GFLDIWYNA ELLVLENER TLDPHDSNVK NLYEKVKSQ LKNAKEIGNG CFEFYHKCDN ECMESVNGT
	501
HA NB # 105	YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI
HA PR8 NYMC	YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI
HA PR8 RKI	YDYPKYSEES KLNREKIDGV KLESMGYQI LAIYSTVASS LVLLVSLGAI SFWMCSNGSL QCRICI

Sequenzvergleich der Viren NB # 105, PR8 NYMC und PR8 RKI. **Blau** und **Grün** zeigen die Unterschiede zwischen zwei der drei Viren, Aminosäuren, die bei allen drei Viren verändert sind, sind **rot**, **Gelb** zeigt die potentiellen Glykosylierungsstellen.

	1
NA NB # 105	MNPNQKIITI GSICLAIGII SLMLQIGNII SIWISHSIQT GSCNHTGICN QRIITYENST MVNHTYVNIH NTNVVAGDK TSVILAGNS LCPIRGWAIY
NA PR8 NYMC	MNPNQKIITI GSICLVGLI SLILQIGNII SIWISHSIQT GSCNHTGICN QNIITYKNST WV-----KDT TSVILTAGNS LCPIRGWAIY
NA PR8 RKI	MNPNQKIITI GSICLVGLI SLILQIGNII SIWISHSIQT GSCNHTGICN QNIITYKNST WV-----KDT TSVILTAGNS LCPIRGWAIY
	101
NA NB # 105	TKDNSIRIGS KGDVFVIREP FISCCHLECR TFFLTQGALL NDKHNSGTVK DRSPYRALMS CPLGEAPSPY NSRFESVAWS ASACHDGMGW LTIGISGPDN
NA PR8 NYMC	SKDNSIRIGS KGDVFVIREP FISCCHLECR TFFLTQGALL NDKHNSGTVK DRSPYRALMS CPVGEAPSPY NSRFESVAWS ASACHDGMGW LTIGISGPDN
NA PR8 RKI	SKDNSIRIGS KGDVFVIREP FISCCHLECR TFFLTQGALL NDRHNSGTVK DRSPYRALMS CPVGEAPSPY NSRFESVAWS ASACHDGMGW LTIGISGPDN
	201
NA NB # 105	GAVAVLKYNG IITETIKSWE KRILRTQESE CVCVNGSCFT IMTDGPSNGA ASYKIFKIEK GRVTKSTEIN APNFHYEECS CYPDTGTVMC VCRDNWRHGSN
NA PR8 NYMC	GAVAVLKYNG IITETIKSWR KKILRTQESE CACVNGSCFT IMTDGPSDGL ASYKIFKIEK GRVTKSIELN APNSHYEECS CYPDTDKVMC VCRDNWRHGSN
NA PR8 RKI	GAVAVLKYNG IITETIKSWR KKILRTQESE CACVNGSCFT IMTDGPSDGL ASYKIFKIEK GRVTKSIELN APNSHYEECS CYPDTDKVMC VCRDNWRHGSN
	301
NA NB # 105	RPWVSFNQNL DYQIGYICSG VFGDNPRPKD GKGSCNPVTV DGADGVKGFS YKYGNGVWIG RTKSNRLRKG FEMIWDPNWG TDTDSDFSVK QDVVAITDWS
NA PR8 NYMC	RPWVSFDQNL DYQIGYICSG VFGDNPRPED GTGSCGPVYV DGAANGVKGFS YRYGNGVWIG RTKSHSSRHG FEMIWDPNWG TETDSKFSVR QDVVAITDWS
NA PR8 RKI	RPWVSFDQNL DYQIGYICSG VFGDNPRPKD GTGSCGPVYV DGAANGVKGFS YRYGNGVWIG RTKSHSSRHG FEMIWDPNWG TETDSKFSVR QDVVAITDWS
	401
NA NB # 105	GYSGSFVQHP ELTGDCIRP CFWVELVRGL PRENTTIWTS GSSISFCGVD SDTANWSWPD GAELPFTIDK
NA PR8 NYMC	GYSGSFVQHP ELTGDCMRP CFWVELIRGR PKE-KTIWTS ASSISFCGVN SDTVDSWPD GAELPFSIDK
NA PR8 RKI	GYSGSFVQHP ELTGDCIRP CFWVELIRGR PKE-KTIWTS ASSISFCGVD SDTVDSWPD GAELPFTIDK

Sequenzvergleich der Viren NB # 105, PR8 NYMC und PR8 RKI. **Blau** und **Grün** zeigen die Unterschiede zwischen zwei der drei Viren, Aminosäuren, die bei allen drei Viren verändert sind, sind **rot**, **Gelb** zeigt die potentiellen Glykosylierungsstellen. **Grau** unterlegt ist die Stielregion des NA dargestellt.

A.3 Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BSA	Bovines Serum Albumin
BTB	Bric-a-brac, Tramtrack, Broad-Komplex
°C	Grad Celsius
CDM	Chemisch definiertes Medium
CDK	Cyclin abhängige Kinase
CPE	Zytopathischer Effekt (cytopathic effect)
cRNA	Complementary RNA (Zwischenprodukt bei der Virusreplikation)
DIP	defective interfering particles
cDNA	complementary DNA (DNA, die aus RNA synthetisiert wurde)
DNA	Desoxyribosenukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-linked Immunosorbent Assay
EM	Elektronenmikroskop
ERK	Extracellular signal-regulated Kinase
FBS	Fetales Rinder Serum (fetal bovine serum)
FP	Fermenterpassage
h	Stunde (hour)
HA	Hämagglutinin
HBEC	Humane Bronchiale Epithelzellen (Human bronchial epithelial cells)
HCl	Salzsäure
Hpi	hours post infection (Stunden nach Infektion)

Anhang

HRP	Horse radish peroxidase (Meerrettich Peroxidase)
IC50	Inhibitorische Konzentration (Konzentration der Substanz die nötig ist für 50 %ige Inhibition)
l	Liter
LF LTX	Lipofectamin™ LTX
m	Milli-
M	Molar
MAPK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MAPKK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MAPKKK	Mitogen aktivierte Protein Kinase
MDBK	Madin Darby Bovine Kidney
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
Min	Minute
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure
μ	Mikro
n	Nano-
NA	Neuraminidase
NP	Nukleoprotein
NS1	Nichtstrukturprotein 1
NS2/NEP	Nichtstrukturprotein 2/nukleäres Exportprotein
P	Passage
PA	Polymeraseprotein azidisch (sauer)
PB1	Polymeraseprotein basisch 1
PB2	Polymeraseprotein basisch 2
PBS	Phosphatpuffer (phosphate buffered saline)
PF	Proteinfrei
PFM	Protein freies Medium
pH	potential hydrogenii

Anhang

PKC	Protein Kinase C
PP	Plauepassage
Raf	Rapidly growing fibrosarcoma oder rat fibrosarcoma
Ras	Rat sarcoma
RG	Reverse Genetik
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein
rpm	Runden pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT PCR	Reverse Transkription Polymerase Kettenreaktion
RTD-PCR	Reverse Transkription Detektion Polymerase Kettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sek	Sekunde
SOP	Standard Arbeitsanweisung
Tab	Tabelle
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
VP	Vorpassage
vRNA	Virale-Ribonukleinsäure
WHO	World Health Organisation (Weltgesundheitsbehörde)

A.4 Abkürzungen der Aminosäuren

A Ala	Alanin	M Met	Methionin
C Cys	Cystein	N Asn	Asparagin
D Asp	Asparaginsäure	P Pro	Prolin
E Glu	Glutaminsäure	Q Gln	Glutamin
F Phe	Phenylalanin	R Arg	Arginin
G Gly	Glycin	S Ser	Serin
H His	Histidin	T Thr	Threonin
I Ile	Isoleucin	V Val	Valin
K Lys	Lysin	W Trp	Tryptophan
L Leu	Leucin	Y Tyr	Tyrosin

A.5 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Sybille Bertram geb. Jung
Geburtsdaten:	11.03.1981 in 35708 Haiger
Familienstand:	verheiratet
Eltern:	Annemarie Ursula Jung, geb. Neugebauer Lothar Jakob Jung

Schulischer Werdegang

08/1991 – 06/2000	Wilhelm-von-Oranien-Schule Dillenburg Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
08/1987 – 07/1991	Grundschule Eschenburg-Wissenbach

Wissenschaftliche Ausbildung

seit 08/2010	DIS AG eingesetzt als QA Spezialist bei Novartis Vaccines & Diagnostics GmbH
02/2007- 07/2010	Promotion bei Novartis Vaccines & Diagnostics GmbH & Co KG (Marburg) auf dem Gebiet der Influenzavirusforschung.
10/2005 - 10/2006	Diplomarbeit am Institut für Virologie am Zentrum für Hygiene und Medizinische Mikrobiologie der Philipps-Universität Marburg, AG Klenk Thema: Untersuchungen von rekombinanten attenuierten Influenza-A-Viren in Endothelzellen
10/2005	Diplomprüfung (Virologie, Mikrobiologie und Parasitologie)
10/2003 – 10/2006	Hauptstudium Biologie an der Philipps-Universität Marburg
09/2002 – 06/2003	Studienaustausch im Rahmen des Erasmusprogramms (Imperial College in London)
10/2000	Studium der Biologie an der Philipps-Universität Marburg (Abschluss: Vordiplom)

Poster

Trusheim H., Roth B., Wilms R., Jung S., Muth R., Eggers M., Elsen M., Lenz-Bauer C., Schwarz K., Schneider S., Kreibich S., Dittmar L., Veit E., Schaar T.

The MDCK 33016-PF cell line is not only suitable for the production of cell-based Influenza vaccine but is also an ideal substrate for Influenza virus isolation. (2007) Toronto, Options for the Control of Influenza VI, Toronto, Kanada 2007

Bertram S., Büttner J., Freiberg F., Roth B., Trusheim H.

Gene expression analysis of influenza infected MDCK33016 PF cells determined by DNA microarray technique for monitoring virus replication.

Research Days Novartis Vaccines, Siena, Italien 2008

Anhang

Eidesstattliche Erklärung

ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Generierung und Charakterisierung eines neuen Donorstammes für die Influenza Saatvirusherstellung und die Charakterisierung von Influenza Viren in verschiedenen Wirtssystemen.“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Dabei bediente ich mich keiner anderen, als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)

Danksagung

Mein Dank gilt zuallererst Herrn Prof. Dr. Hans-Dieter Klenk dafür, dass er es mir ermöglicht hat, meine Doktorarbeit bei Novartis Vaccines and Diagnostics GmbH durchzuführen.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei den Mitgliedern der Prüfungskommission bedanken, bestehend aus Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach, Herrn Prof. Dr. Erhard Bremer und Herrn Prof. Dr. Michael Bölker, der freundlicherweise die Betreuung meiner Doktorarbeit am Fachbereich Biologie übernommen hat.

Danken möchte ich natürlich auch Frau Dr. Heidi Trusheim, die es mir ermöglicht hat, meine Promotion in ihrem Labor durchführen zu können. Die Diskussionen mit dir waren sehr hilfreich. Außerdem warst du mir immer eine große Unterstützung bei allem, was ich geplant habe.

Weiterer Dank gilt dem ganzen Team der AG Trusheim (Sabrina, Claudia und Anke). Ich hab mich sehr wohl gefühlt bei euch, und wir hatten eine tolle Zeit gemeinsam.

Zusätzlich möchte ich mich ganz besonders bei Jenni und dem ganzen Team der AG Matrosovich und Klenk bedanken, die mir in wissenschaftlichen Fragen immer zur Seite gestanden haben.

Danken möchte ich auch dem Team der gesamten Technologie Entwicklung in Marburg, die mich sehr gut bei meiner Promotion unterstützt haben.

Meinem Mann Sven Bertram möchte ich für die Geduld mit mir danken. Er hatte immer ein offenes Ohr für meine Probleme und wusste mich stets zu motivieren.

Auch Torsten, Susann und Tassilo möchte ich für die große Unterstützung während der gesamten Zeit ganz herzlich danken.

Zuletzt und ganz besonders, möchte ich meinen Eltern Ursula und Lothar Jung herzlichst danken. Sie haben mich in meinen Vorhaben stets unterstützt, motiviert und waren immer für mich da. Vielen Dank auch für die finanzielle Unterstützung, ohne die ein so schnelles und sorgenfreies Studium nicht möglich gewesen wäre.